Bioaugmentation of kerosene from contaminated soils by Pseudomonas putida and Serratia marcescens isolated of the activated sludge and a study on their growth

Farshid Kafilzadeh
* Associated professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. (Corresponding author). Kafilzadeh@jia.ac.ir

Zeinab Khaledi
Msc, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Received: 25 September 2015
Accepted: 03 December 2015

ABSTRACT

Background & Objective: Bioaugmentation is a great technique in bioremediation of contaminated soils with petroleum hydrocarbons. The aim of this study was to evaluate the effect of isolated bacteria from activated sludge as non-indigenous bacteria in bioremediation of kerosene contaminated soils and study the growth of isolated bacteria in the presence of different concentrations of this product**.**

Materials & Methods: Sampling of activated sludge was taken from two treatment plants in Assaluyeh region. Isolation of degrading bacteria was performed by culturing the samples on basal mineral medium. Emulsification test and evaluating growth of bacteria were carried out in different concentrations of kerosene. Isolated bacteria were inoculated to polluted soils with kerosene oil compound for bioaugmentation. The evaluation of their bioremediation potential and the rate of biodegradation were measured by infrared spectroscopy (IR).

Results: In this study, two bacteria *Pseudomonas putida* and *Serratia marcescens* were isolated and identified as kerosene degrading bacteria from activated sludge. *P. putida* was recognized as the most powerful degrading bacterium of this oil product according to emulsification tests, measuring the growth of bacteria in various concentrations of kerosene, the results of Bioaugmentation of contaminated column of soil with kerosene and reduce the level of TPHs.

Conclusion: In regard to adaptation of activated sludge bacteria with variety of pollutants in sewage, they can be used as non-indigenous bacteria for bioaugmentation and cleaning up contaminated soil with petroleum hydrocarbons.

Keywords: Bioaugmentation, Kerosene, Activated sludge, Pseudomonas putida, Serratia marcescens

▶ **Citation**: Kafilzadeh, F. Khaledi, Z. Bioaugmentation of kerosene from contaminated soils by Pseudomonas putida and Serratia marcescens isolated of the activated sludge and a study on their growth. *Iranian Journal of Research in Environmental Health*.Fall 2015;1 (3) : 155-164.

زیست‌افزایی خاک‌های آلوده به کروزن، به‌وسیله سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس جداشده از لجن فعال و بررسی میزان رشد آنها

فرشید کفیل زاده
* دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست‌شناسی، جهرم، ایران. (نویسنده مسئول)
Kafilzadeh@jia.ac.ir

زینب خالدی
کارشناس ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست‌شناسی، جهرم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: زیست‌افزایی، یکی از روش‌های برتر در اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی است. هدف از این پژوهش، ارزیابی میزان تأثیر باکتری‌های جداشده از لجن فعال به‌عنوان باکتری‌های غیربومی، در اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به کروزن و بررسی رشد باکتری‌های جداشده در حضور غلظت‌های متفاوت این فرآورده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از لجن فعال دو کمپ تصفیه‌خانه منطقه عسلویه صورت گرفت. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده با کشت نمونه‌ها روی محیط پایه معدنی انجام شد. تست امولسیفیکاسیون و ارزیابی رشد باکتری‌ها در غلظت‌های متفاوت کروزن صورت گرفت. برای زیست فزونی و سنجش میزان پاک‌سازی زیستی، باکتری‌های جداشده به ترکیب نفتی کروزن به خاک‌های آلوده تلقیح شدند و میزان تجزیه زیستی به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی مادون‌قرمز (IR) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۲ باکتری سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس از لجن فعال، به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به تست‌های امولسیفیکاسیون، سنجش رشد باکتری‌ها در غلظت‌های گوناگون کروزن و نتایج به‌دست‌آمده از زیست‌افزایی ستون‌های خاک‌آلوده به کروزن و کاهش سطح TPHs، باکتری سودوموناس پوتیدا به‌عنوان قوی‌ترین باکتری تجزیه‌کننده این فرآورده نفتی شناخته شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به سازگار شدن باکتری‌های لجن فعال با انواع آلاینده‌های موجود در فاضلاب، می‌توان از آنها به‌عنوان باکتری‌های غیربومی برای زیست‌افزایی و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: زیست افزایی، کروزن، لجن فعال، سودوموناس پوتیدا، سراشیا مارسسنس

◀ **استناد**: کفیل‌زاده، ف. خالدی، ز. زیست‌افزایی خاک‌های آلوده به کروزن، به‌وسیله سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس جداشده از لجن فعال و بررسی میزان رشد آنها. *فصلنامه پژوهش در بهداشت محیط*. پاییز ۱۳۹۴؛۱ (۳): ۱۵۵-۱۶۴.

مقدمه

صنعت پالایش نفت، نفت خام را به بیش از ۲۵۰۰ محصول تصفیه‌شده تبدیل می‌کند. گاز نفتی مایع، بنزین، کروزن (نفت سفید)، سوخت هواپیما، سوخت گازوئیل، سوخت‌های نفتی، گریس و مواد سوخت برای صنعت پتروشیمی، نتایج مستقیم این فعالیت‌ها هستند (۱). کروزن مایع، هیدروکربنی بی‌رنگ و اشتعال‌پذیر است و از تقطیر جزءبه‌جزء نفت خام در دمای ۱۵۰ و ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید (۲). کروزن نخستین بخش سوخت پس از تقطیر بعضی از ساختارهای بسیار فرار از قبیل نفتا و بنزن است (۳). این مایع هیدروکربنی از پارافین (آلکان‌ها)، سیکلوپارافین (سیکلوآلکان‌ها)، آروماتیک‌ها و اولفین‌ها تشکیل شده است (۴). کروزن که بیش از ۶۰ درصد بخش اصلی سوخت‌های هواپیمایی (جت) تشکیل می‌دهد، در سیستم گرمایی به‌عنوان یک تمیزکننده یا حلال استفاده می‌شود (۵).

استفاده از مقادیر زیاد ترکیبات نفتی، سبب آلودگی بالای محیط‌زیست می‌شود. بالا رفتن مقدار هیدروکربن‌های نفتی در خاک، موجب کاهش معنی‌داری در کیفیت خاک می‌شود و این خاک‌ها غیرقابل استفاده می‌گردند (۶). مدت‌زمان تماس طولانی و غلظت بالای فرآورده‌های نفتی در بدن، ممکن است موجب گسترش بیماری‌های کبدی و کلیوی شود و امکان آسیب به مغز استخوان و خطر سرطان را افزایش دهد (۲). تماس با کروزن سبب سوزش چشم‌ها و پوست، اختلالات تنفسی، استفراغ، ورم معده، سرفه، انقباض عضلات و اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۷). یکی از بهترین پیشنهادها در اصلاح خاک‌های آلوده، استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که توانایی تجزیه ترکیبات سمی در فرآیند اصلاح زیستی را دارند. اصلاح زیستی، روشی جذاب برای پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفت خام است؛ زیرا در نواحی وسیع قابل کاربرد و کم‌هزینه است و سبب از بین رفتن کامل آلودگی می‌شود (۸).

دو روش فنی اصلاح زیستی وجود دارند که می‌توانند در همه فناوری‌های در دسترس، برای به حداکثر رسیدن بازده تیمار استفاده شوند. یکی روش تحریک زیستی است که سبب افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی از طریق اضافه کردن مواد غذایی و پذیرنده نهایی الکترون می‌شود. دیگری روش زیست‌افزایی[1] است که افزایش تجزیه مواد آلاینده از طریق اضافه کردن گونه‌های میکروبی تجزیه‌کننده خارجی را در پی دارد (۹). تصور می‌شود وقتی تحریک زیستی کافی نباشد، زیست فزونی رویکردی است که باید به کار رود (۱۰). در طول چند سال اخیر، ترکیبات آلاینده از قبیل حشره‌کش‌ها، مواد نفتی و شمار زیادی از مواد شیمیایی با استفاده از زیست‌افزایی، با موفقیت پاک‌سازی شده‌اند (۱۱).

«آیسلابی» و همکاران در سال ۲۰۰۶، اصلاح زیستی هیدروکربن‌ها را در خاک‌های آلوده مناطق قطبی بررسی کردند. شرایط محیطی در خاک‌های قطبی از قبیل نوسانات دمایی خاک، کاهش سطح مواد مغذی، رطوبت و pH نامناسب، عامل‌های محدودکننده فعالیت میکروبی و کاهنده تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها هستند. مطالعه آنها ثابت کرد که استفاده انواعی از باکتری‌های تجزیه‌کننده از قبیل رودوکوکوس[2] و سودوموناس[3] به‌عنوان باکتری‌های غیربومی، برای اصلاح زیستی خاک‌های آلوده قطبی مناسب‌اند (۱۲). سیستم تصفیه فاضلاب از قبیل لجن فعال به فعالیت جمعیت ارگانیسم‌های زنده وابسته است. بیشتر باکتری‌های موجود در لجن فعال به جنس‌های گرم منفی تعلق دارند. جنس‌های اصلی شامل آکروموباکتر[4]، آلکالی‌ژنز[5]، باسیلوس[6]، فلاووباکتریوم[7]، میکروکوکوس[8] و سودوموناس هستند (۱۳). «حسینی» و همکارانش در سال ۲۰۰۷، دو باکتری سودوموناس بتلی[9] و اسینتوباکتر جونسونی[10] را از لجن فعال

1. Bioaugmentation
2. Rhodococcus
3. Pseudomonas
4. Achromobacter
5. Alcaligenes
6. Bacillus
7. Flavobacterium
8. Micrococcus
9. P. beteli
10. Acinetobacter johnsonii

جداسازی کردند که به ترتیب توانایی تجزیه ۹۷/۲ و ۹۶/۴ درصد از سورفاکتانت‌های آنیونی را داشتند (۱۴).

در تحقیق «جوتیو» و همکارانش در سال ۲۰۰۳، نشان داده شد که اضافه کردن لجن فعال به خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها، تجزیه هیدروکربن‌ها را تحریک می‌کند و سبب تجزیه بالای آلکان‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی(PAHs) می‌شود. در این بررسی، مشخص شد که میکروارگانیسم‌های موجود در لجن ازجمله باکتری‌ها می‌تواند دلیل اصلی تجزیه بالای آلکان‌ها باشد که برای تجزیه هیدروکربن‌ها، قدرت سازگار شدن با محیط را دارند (۱۵). «روجاس» و همکارانش در سال ۲۰۰۷، پنج باکتری را از لجن فعال موجود در سیستم فاضلاب شهری جداسازی و شناسایی کردند و به کمک آنها، محیط‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی را پاک‌سازی زیستی نمودند. در این پژوهش مشخص شد که باکتری‌های جداسازی شده از مخلوط لجن فعال، می‌توانند ترکیبات مشتق از سیستم‌های فاضلاب در فرایندهای نفتی و صنایع پتروشیمی از قبیل ۱، ۱، ۲ تری کلرواتان و اتیل بنزن را تجزیه کنند (۱۶).

استفاده از روش زیست‌افزایی برای کاهش آلاینده‌های نفتی، مستلزم جداسازی و شناسایی باکتری‌های غیربومی مؤثر و سپس به‌کارگیری آنها برای فرآیند اصلاح زیستی است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش‌های پژوهشگران، لجن فعال منبع غنی از جمعیت باکتری‌هاست که توانایی تجزیه آلاینده‌های گوناگون را دارد. هدف از این تحقیق، استفاده از باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس جداشده از لجن فعال به‌دست‌آمده از تصفیه فاضلاب شهری منطقه ویژه عسلویه، برای خاک‌های آلوده به کروزن و کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) و همچنین، بررسی میزان رشد آنها در حضور غلظت‌های متفاوت این فرآورده نفتی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از لجن فعال دو تصفیه‌خانه فاضلاب شهری کمپ ۱ و ۲ و کمپ ۵ منطقه ویژه عسلویه، واقع در استان بوشهر در ایران انجام شد. نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای استریل درب‌دار ریخته شدند و در مدت‌زمان کمتر از ۲۴ ساعت، در فلاسک‌های حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافتند. از محیط MBS [1] برای غنی‌سازی و انجام آزمایش‌های بیشتر استفاده شد. در ابتدا با هدف انجام غنی‌سازی، ۹۵ ml از محیط کشت پایه باکتریایی درون فلاسک‌های ۲۵۰ ml ریخته و حدود ۵ ml نمونه لجن فعال هر کمپ به هر فلاسک اضافه شد. سپس فلاسک‌ها با ۱ درصد کروزن (V/V) به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی تکمیل گردیدند. محیط غنی‌شده در دمای ۳۰°C با انجام هوادهی در گرماخانه شیکردار انکوبه شد. برای غنی‌سازی بیشتر باکتریایی و مشاهده کدورت، این فرایند به مدت سه هفته با فواصل هفت‌روزه انجام شد (۱۷ و ۱۸). سپس یک میلی‌لیتر از محیط مایع به‌دست‌آمده از آخرین غنی‌سازی به روش پورپلیت، بر سطح محیط MBS آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در ۳۰°C به مدت ۳ تا ۵ روز انکوبه شدند و کلنی‌های باکتریایی که از نظر ظاهر متفاوت بودند، به طور متوالی روی محیط جامد پایه معدنی حاوی کروزن و سپس بر محیط بلاد آگار خالص‌سازی گردیدند (۱۹).

پس از جداسازی سویه‌های تجزیه‌کننده کروزن، برای تشخیص قوی‌ترین و توانمندترین باکتری‌های تجزیه‌کننده از تست آمیزندگی استفاده شد. در این مرحله پس از تهیه سوسپانسیون باکتری‌های انتخاب‌شده در مرحله قبل، بر اساس ۰/۵ مک فارلند آنها را به محیط MSS [2] حاوی ۰/۵ درصد کروزن (V/V) تلقیح کردیم و پس از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس [3] در دمای ۳۰ درجه، به مدت ۳ روز گرماخانه‌گذاری گردیدند. این کار برای همه کلنی‌های انتخاب‌شده تکرار شد. پس از گرماخانه‌گذاری، لوله‌ها دوباره با ورتکس مخلوط و به مدت دو ساعت دیگر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری شدند و میزان آمیزندگی از ۰ تا ۴ گزارش گردید. برای افزایش دقت، تست امولسیفیکاسیون طی چندین بار تکرار شد. با بررسی

1. Mineral Basal Salt
2. Mineral Salt Medium
3. Vortex

متوسط میزان آمیزندگی در لوله‌های مربوط به هر باکتری، سویه‌هایی که میزان آمیزندگی بالاتری داشتند، جزو سویه‌های پرقدرت به شمار آمدند (۲۰).

پس از انتخاب قوی‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده کروزن، برای شناسایی کلنی‌های باکتری‌های جداشده از تست‌های استاندارد از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسید فاست، مورفولوژی و رنگ کلنی استفاده شد؛ همچنین، مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد بر اساس کتاب راهنمای برگی از قبیل تست‌های اکسیداز، کاتالاز، TSI، اوره، سیمون سیترات، ایندول، متیل رد، VP، احیاء نیترات، رشد بر روی محیط مک کانکی، حرکت باکتری و همچنین تست‌های قندی از قبیل تخمیر لاکتوز، سوکروز و گلوکز، به کار برده شدند (۱۷ و ۲۱). به‌منظور ارزیابی و تعیین منحنی رشد باکتری‌های مورد بررسی در حضور غلظت‌های متفاوت کروزن، روش سنجش دانسیته نوری (OD) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید. به تعداد هر باکتری ۳ فلاسک از محیط حاوی پایه معدنی با غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد کروزن (v/v) به همراه سوسپانسیون باکتری در نظر گرفته شد. سوسپانسیون باکتری بر طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه و از آن به میزان ۵ میلی‌لیتر به هر کدام از محیط‌های کشت اضافه شد. در این بررسی، یک فلاسک به‌عنوان کنترل حاوی محیط پایه معدنی و سویه بررسی گردید و بدون کروزن در نظر گرفته شد. محیط‌ها، در دمای ۳۰°C و با دور ۱۲۰ rpm در انکوباتور شیکردار به مدت ۷ روز گرماخانه گذاری شدند. در نهایت، میزان دانسیته نوری هر کدام از باکتری‌ها در غلظت‌های متفاوت به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm با فواصل ۱۲ ساعته اندازه‌گیری و سپس منحنی رشد باکتری‌های مورد بررسی ترسیم شد (۱۷ و ۲۲).

برای انجام آزمایش زیست‌افزایی، خاک اولیه از سایت دانشگاه آزاد واحد جهرم انتخاب شد. نمونه خاک برای آنالیز بررسی گردید. نتایج بررسی‌ها نشان داد خاک این منطقه، فاقد هرگونه آلاینده‌های هیدروکربنی است. نمونه خاک پس از خشک کردن در هوا، از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و استریل کردن آن، طی سه مرحله در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو گردید. در ادامه، نمونه‌های خاک در شرایط کاملاً استریل در زیر هود به ۴۵۰ گرم تقسیم و به ازای هر ۱۰۰ گرم خاک، ۴ ml کروزن برای آلودگی خاک استفاده شد که به‌وسیله فیلتر ۰/۲ mμ بر روی خاک اسپری گردید تا به‌طور کاملاً همگن و یکنواخت آلوده شوند (۸ و ۲۳). ۴۵۰ گرم از نمونه‌های خاک‌آلوده به کروزن در ستون‌های استوانه‌ای شکل از جنس شیشه در حجم ۱ لیتری به ابعاد ۲۵ cm طول و ۱۶ cm قطر داخلی ریخته شد. سر این ستون‌ها با ورقه آلومینیومی پوشیده و در دمای اتاق (۲۷°C) نگهداری شدند. خاک‌های موجود در ستون به‌منظور فراهم شدن هوا و اکسیژن کافی، هر هفته مخلوط گردیدند. همچنین خاک‌ها برای فراهم شدن رطوبت مورد نیاز، با افزودن ۲۰ ml آب مقطر استریل‌شده در هر هفته تا پایان آزمایش نمدار شدند. همه این عملیات در شرایط کاملاً استریل انجام شدند (۸).

به‌منظور بررسی نقش سویه‌های جداشده از لجن فعال در تجزیه کروزن، سوسپانسیونی از سویه‌های منتخب تهیه شد. به این صورت، یک لوپ پر از کلنی در داخل ۴۰ ml نوترینت براث استریل تلقیح گردید. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه برای ۱۲ ساعت با درجه حرارت ۳۰°C گرماخانه‌گذاری شدند. ستون‌های خاک در دمای اتاق (۲۷ °C) به مدت ۴۵ روز برای بررسی فرآیند زیست‌افزایی نگهداری گردیدند (۸ و ۱۸). به‌منظور آنالیز تغییرات کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در نمونه‌های خاک‌آلوده به کروزن، از روش EPA ۱۶۶۴ استفاده شد. ابتدا کروزن موجود در نمونه به‌وسیله حلال هگزان استخراج و پس از آن به سل دستگاه IR تزریق شد. دستگاه IR مورد استفاده در این تحقیق، مدل HATR-T۲ ساخت شرکت Wilks Enterprise بود. درصد تجزیه ترکیبات نفتی و کاهش TPH به‌وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$[(\text{TPH control} - \text{TPH trearment}) / \text{TPH control}] \times ۱۰۰$$

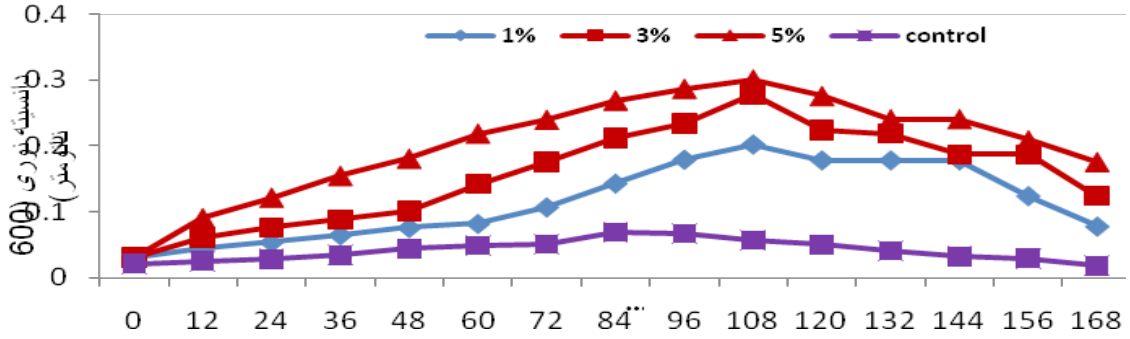
یافته‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون t-Student بررسی شدند و p>۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته ها

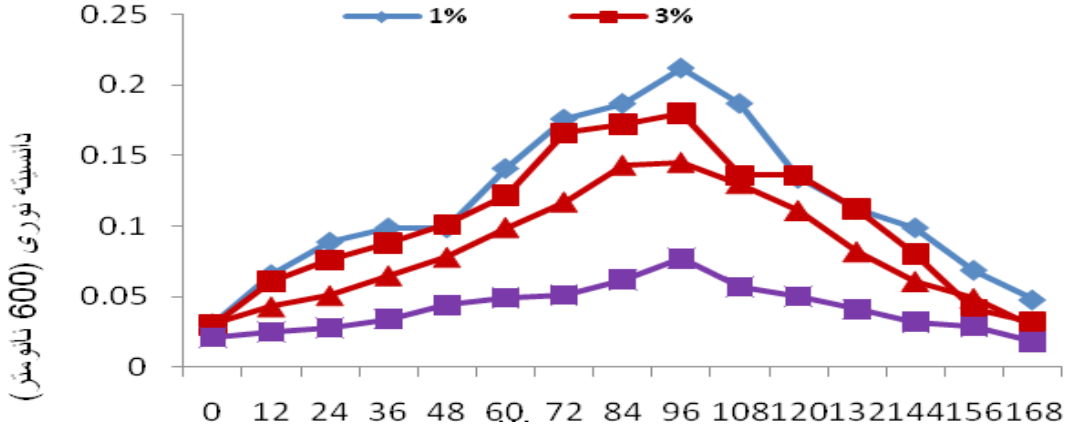
جنس‌های گوناگون باکتریایی از لجن فعال به‌دست‌آمده از تصفیه فاضلاب جدا شدند و همگی رشد خوبی روی محیط پایه نمکی حاوی کروزن از خود نشان دادند که بیانگر استفاده از این ماده، به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی به‌وسیله باکتری‌ها بود. با بررسی رشد جدایه‌ها بر محیط کشت پایه معدنی براث و آگار واجد کروزن و تست آمیزندگی، به‌منظور انتخاب قوی‌ترین باکتری‌های تجزیه‌کننده، دو باکتری سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس برای بررسی فرآیند زیست‌افزایی و رشد انتخاب شدند. متوسط میزان آمیزندگی این دو باکتری به ترتیب ۳/۸ و ۲/۶ بود (p >۰/۰۵).

نتایج بررسی نمودار رشد دو باکتری مورد بررسی، طی ۷ روز نشان داد که سودوموناس پوتیدا بهترین رشد را در بالاترین غلظت کروزن (۵۷/۷ درصد) داشت؛ به‌طوری‌که این باکتری بالاترین دانسیته نوری را در طول موج ۶۰۰ nm با ارزش ۰/۳۰۱ بعد از ۱۰۸ ساعت در غلظت ۵ درصد داشت. رشد این باکتری با کاهش غلظت فرآورده نفتی کاهش یافت (نمودار ۱). سراشیا مارسسنس، در غلظت(v/v) ۱ درصد بالاترین رشد و دانسیته نوری را داشت. دانسیته نوری این باکتری در طول موج ۶۰۰ nm در این غلظت، ۰/۲۱۲ در ساعت ۹۶ بود؛ درحالی‌که رشد این باکتری در حضور غلظت‌های بالاتر کروزن کاهش پیدا کرد (نمودار ۲).

نمودار ۱. منحنی رشد سودوموناس پوتیدا در غلظت‌های گوناگون کروزن



نمودار ۲. منحنی رشد سراشیا مارسسنس در غلظت‌های گوناگون کروزن



میزان اولیه TPH اندازه‌گیری شده در ستون خاک به‌وسیله دستگاه IR برابر با ۱۴۵۰ ppm بود که این میزان پس از ۳۰ روز در ستون خاک تلقیح‌شده با سودوموناس پوتیدا به ppm ۴۲۰ و در ستون خاک تلقیح‌شده با سراشیا مارسسنس به ppm ۶۰۵ کاهش یافت ($p>0/05$). با ارزیابی میزان TPH در ستون‌های خاک در زمان اولیه و ۳۰ روز پس از تیمار، مشخص شد سودوموناس پوتیدا ۷۱/۰۳ درصد و سراشیا مارسسنس ۵۸/۲۷ درصد از پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به کروزن را انجام داده‌اند. با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تست امولسیفیکاسیون، میزان رشد و میزان کاهش TPH ستون‌های خاک‌آلوده به کروزن، سودوموناس پوتیدا در مقایسه با سراشیا مارسسنس، باکتری قوی‌تری در تجزیه کروزن شناخته شد.

بحث

لجن فعال به‌عنوان کود آلی ازلحاظ تجمع باکتریایی بسیار غنی است. «شریفی یزدی» و همکاران (۲۰۰۱) موفق شدند باکتری‌های موجود در لجن فعال را شناسایی کنند. در این تحقیق، باکتری‌های شناسایی‌شده به جنس‌های فلاووباکتریوم، سودوموناس و میکروکوکوس تعلق داشتند (۱۳). در پژوهش «جوتیو» و همکاران (۲۰۰۳) مشخص شد که اضافه کردن لجن فعال به خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها، فرآیند تجزیه را تحریک می‌کند و سبب تجزیه بالای آلکان‌ها می‌شود. در این بررسی مشخص شد عامل اصلی تجزیه آلکان‌ها، مواد مغذی موجود در لجن نیست؛ بلکه دلیل آن می‌تواند وجود میکروارگانیسم‌های موجود در لجن ازجمله باکتری‌ها باشد که قدرت سازگار شدن برای تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند (۱۵). این تحقیق، قدرت بالای باکتری‌های جداشده از لجن فعال در تجزیه فرآورده نفتی کروزن را نشان داد. استفاده از روش غنی‌سازی و استفاده از محیط MBS براث حاوی کروزن برای جداسازی این باکتری‌ها، در ابتدای آزمایش به شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده قوی و سازگار نسبت به دیگر باکتری‌های موجود در لجن فعال کمک بسیاری کرد. در واقع، کروزن اضافه‌شده به محیط کشت سبب غنی شدن محیط برای گونه‌های تجزیه‌کننده شد؛ درحالی‌که گونه‌هایی که سازگاری کمتری در میان جمعیت تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی داشتند، به‌تدریج حذف شدند.

در این مطالعه، گونه‌های سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس به‌عنوان سویه‌های قوی تجزیه‌کننده کروزن از میان باکتری‌های تجزیه‌کننده موجود در لجن فعال شناسایی شدند و از آنها برای کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی و میزان رشد در حضور غلظت‌های گوناگون استفاده گردید. با بررسی میزان رشد باکتری‌ها در طول موج nm ۶۰۰ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، مشخص شد رشد باکتری سراشیا مارسسنس با افزایش غلظت کروزن کاهش یافت. کاهش رشد این باکتری می‌تواند به دلیل سمی بودن این فرآورده نفتی باشد.

هیدروکربن‌های لیپوفیلیک موجود در ترکیبات نفتی، با تجمع در غشای دو لایه باکتری، بر خواص ساختمانی و عمل این غشا اثر می‌گذارد و سبب از بین رفتن غشا، افزایش نفوذپذیری پروتون و تخریب ثبات pH درون‌سلولی می‌شود (۲۴). «کفیل‌زاده» و همکاران (۲۰۱۱) توانستند باکتری‌های تجزیه‌کننده پیرن را جداسازی و شناسایی کنند. در این تحقیق با بررسی میزان رشد باکتری‌های جداسازی شده در طول موج nm ۶۰۰، رشد پایین باکتریایی در غلظت‌های بالای ترکیبات آروماتیکی مشاهده شد که با نتایج بررسی میزان رشد سراشیا مارسسنس در این تحقیق مطابقت دارد (۱۷). اما در سودوموناس پوتیدا با افزایش غلظت کروزن، میزان رشد باکتری افزایش یافت؛ به‌طوری‌که این باکتری در غلظت ۵ درصد بیشترین رشد را داشت. این نتیجه با نتایج پژوهش «نامچی» و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. در بررسی آنها، ارتباط مستقیم بین میزان رشد باکتری‌ها و غلظت هیدروکربن مورد بررسی، اثبات شد (۲۵).

سودوموناس در محیط‌های گوناگون مقاومت بالایی دارد. قدرت تجزیه‌کنندگی سودوموناس پوتیدا به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌هایی است که سبب افزایش امولسینه شدن هیدروکربن‌های نفتی و تغییر کشش سطحی و اتصال هیدروکربن

به سطح سلول باکتری‌ها می‌شوند (۲۶). سودومومناس دارای آنزیم‌های گوناگون تجزیه‌کننده است که می‌تواند ترکیبات هیدروکربنی مختلف را تجزیه کند. ممکن است در شرایطی که این باکتری در معرض غلظت بالای فرآورده‌های نفتی قرار می‌گیرد، آنزیم‌هایی تولید کند که شرایط تجزیه بهتر آن فرآورده‌ها و تکثیر بیشتر نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن فراهم شود. در این مطالعه، از دو باکتری شناسایی‌شده برای تلقیح و زیست‌افزایی خاک‌های آلوده به کروزن استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ستون‌های خاک تلقیح‌شده با سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس، حاکی از توانایی بالای باکتری‌های جداشده از لجن فعال به‌عنوان باکتری‌های غیربومی در کاهش TPH و تجزیه کروزن بود. این نتایج نشان دادند سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس پس از ۳۰ روز فرآیند زیست‌افزایی و تلقیح به ستون خاک، به ترتیب ۷۱/۰۳ و ۵۸/۲۷ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک را کاهش دادند که این نتایج، با پژوهش‌های بسیاری از پژوهشگران که در زمینه پاک‌سازی زیستی و زیست‌افزایی خاک‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی تحقیق کرده‌اند، مطابقت دارد.

در پژوهشی که توسط «داس» و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد، برای تجزیه زیستی ترکیبات نفتی از سویه‌های باسیلوس سابتیلیس[1] و سودوموناس آئروژینوزا[2] استفاده گردید. در این بررسی، سطح TPH را در خاک کنترلی و نمونه آزمایش اندازه‌گیری کردند؛ به‌طوری‌که مشخص شد سطح TPH در پایان آزمایش کاهش معنی‌داری داشته است (۲۷). «وانگسا» و همکاران (۲۰۰۴) دو سویه جدید از سودوموناس آئروژینوزا و سراشیا مارسسنس به ترتیب به نام‌های WatG و HokM از چندین منطقه هوکایدو ژاپن جداسازی کردند که توانایی بالایی در تجزیه طیف وسیعی از هیدروکربن‌های موجود در بنزین، کروزن، گازوئیل و گریس داشتند. در بررسی آنها مشخص شد که سویه WatG نسبت به سویه HokM در تجزیه ترکیبات نفتی، سویه پرقدرت‌تری است. سویه WatG حدود۹۵ -۹۰ درصد از ترکیبات گازوئیل و کروزن و سویه HokM حدود ۶۰-۵۰ درصد از این ترکیبات را تجزیه کردند (۶). «تهان» و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از دو باکتری جداشده از خاک و تلقیح آنها به لجن‌های نفتی، میزان تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی را افزایش دادند. در بررسی آنها، تلقیح طی دو مرحله در دوره‌های زمانی ۶۲ و ۱۹۸ روزه انجام شد که در نهایت بیش از ۳۰ درصد از TPH کاهش یافت (۲۸).

در این تحقیق با بررسی نتایج به‌دست‌آمده از تست امولسیفیکاسیون، میزان رشد باکتری‌ها در غلظت‌های گوناگون کروزن و زیست‌افزایی ستون‌های تلقیح‌شده با باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس مشخص گردید. این دو باکتری، گونه‌های توانمندی برای تجزیه کروزن و کاهش آلودگی‌های نفتی به شمار می‌آیند. قدرت بالای امولسیفیه کردن کروزن به‌وسیله این دو باکتری در تحقیقات دیگران نیز گزارش شده است. برای نمونه، «شاه‌علیان» و همکاران در سال ۲۰۱۵ با توجه به تست امولسیفیکاسیون برای کروزن، به این نتیجه رسیدند که سودوموناس جداشده از رسوبات خور موسی تقریباً نیمی از کروزن را در مدت ۲ ساعت امولسیفیه کرد که باکتری توانمندی برای اصلاح زیستی هیدروکربن‌هاست (۲۹). همچنین «وی» و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که سراشیا مارسسنس (سویه SS-۱) می‌تواند ۷۲ درصد از کروزن را امولسیفیه کند (۳۰).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد لجن فعال تصفیه‌خانه شهری منطقه عسلویه، دو باکتری سودوموناس پوتیدا و سراشیا مارسسنس دارد که قدرت سازگاری بالایی با کروزن دارند. با استفاده از دو باکتری یادشده به‌عنوان باکتری‌های غیربومی، می‌توان برای زیست‌افزایی و پاک‌سازی محیط‌های آلوده به‌ویژه خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از ریاست محترم پژوهش و فناوری منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس جنوبی (عسلویه) به دلیل حمایت اجرایی اعلام می دارند.

1. B. subtilis DM-04
2. P.aeruginosa MNM

References

1. Benyahia F, Abdulkarim M, Embaby A, Rao M, editors. Refinery wastewater treatment: a true technological challenge. The 7th Annual UAE University Research Conference; 2006 Apr 22-25; Al Ain, United Arab Emirates: 2006. p. 186-93.
2. Gouda MK, Omar SH, Nour Eldin HMN, Chekroud ZA. Bioremediation of Kerosene II: a case study in contaminated clay (Laboratory and field: scale microcosms). Word J Microbiol Biotechnol 2008; 24(8): 1451-1460.
3. Adesanwo T, Rahman M, Gupta R, de Klerk A. Characterization and refining pathways of straight-Run heavy naphtha and distillate from the solvent extraction of lignite. Energ Fuel 2014; 28(7):4486-95.
4. Agarry SE, Owabor, CN, Yusuf RO. Enhanced bioremediation of soil artifically contaminated with kereosene: Optimization of biostimulation agents through statistical experimental design. J Pet Environ Biotechnol 2012; 3(3): 1-8.
5. Chilcott RP. Compendium of chemical hazards: Kerosene (Fuel Oil), UK Health Protection Agency 2006, www.who.int/ipcs/emergencies/kerosene.pdf.
6. Wongsa, P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzaman M, Yumato I, Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of Pseudomonas aeruginosa and Seratia marcescens possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. Curr Microbiol 2004; 49 (6): 415-422.
7. Ejiro KH, Eseoghene A. Effect of acute kerosene toxicity on the histology of the small intestine, intestinal enzyme amylase and malondialdehyde (MDA) on adults male Wistar rats. Journal of Natural Sciences Research 2015; 5(4): 53-57.
8. Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with dieseoil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresour Technol 2005; 96(9): 1049-1055.
9. Trindade PVO, Sobral L. G, Rizzo ACL, Leite SGF, Lemos JLS, Millioli VS, Soriano AU. Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. 9th International Petroleum Environmental Conference, 21-25 October 2002, Novo Mexico, EUA.
10. Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiol Res 2010; 165(5): 363-375.
11. Alisi C, Musell R, Tasso F, Ubaldi C, Manzo S, Cremisini C, Sprocati AR. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. Sci Total Environ 2009; 407(8): 3024-32.
12. Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles 2006; 10(3): 171-179.
13. Sharifi-Yazdi MK, Azimi C, Khalili MB. Isolation and identification of bacteria present in the actirated sludge auanit, in the treatment of industrial waste water. Iran J Publ Health 2001; 30(3-4): 91-94.
14. Hosseini F, Malekzadeh F, Amirmozafari N, Ghaemi N. Biodegradiat of anionic surfactants by isolates bacteria from activated sludge. Int J Sci Tech 2007; 4(1): 127-132.
15. Juteau P, Bisaillon JG, Lepin F, Ratheu V, Beaudet R, Villemur R. Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated by addition of activated sludge taken from the waste water treatment fracilities of an oil refinery. Biodegradation 2003; 14(1): 31-40.
16. Ali A, Naseem F. Frequency distribution of bacteria isolated from different industrial effluent. Daffodil International University Journal of Science and Technology 2012; 7(1):28-33.
17. Kafilzadeh F, Hoshyaripour F, Afrough R, Jamali H, Allahverdi Gh. Isolation and identification of pyrene-degrading bacteria from soils around landfils in Shiraz and their growth kinetic assay. J Fasa Univ Med Sci 2011; 3(1): 98-103.
18. Rahman KS, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Occurrence ofcrude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. J Basic Microbiol 2002; 42 (4): 284-291.
19. Shafiee P, Shojaosadaati SA, Charkhabi AH. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacteria culture isolation from hydrocarbon polluted soils. Iran J Chem Chem Eng 2006; 25(3): 73-78.
20. Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH. Emulsification of hydrocarbons bysubsurface Bacteria. J Ind Microbiol 1991; 8(4): 237- 245.
21. Garrity GM. In Brenner DJ, Krig NR, Staley JT (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York, Springer, 2005: 323-384.
22. Kafilzadeh F, Javid H, Mohammadi H. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria of Tashk lake and salt concentration effect on them. Iran Sci Fish J 2007; 6(3): 103-112.
23. Sharifi Hosseini S, Shahbazi A, Yazdipoor A, Kamranfar I. The effect of agricultural fertilizers on bioremediation of a crude-oil polluted soil. Journal of Water and Soil 2010 23(3): 145-155.
24. Nwanna IEM, George GO, Olusoji IM. Growth study on chrysene degraders isolated from polycyclic hydrocarbon polluted soils in Nigeria. Afr J Biotechnol 2006; 5(10): 823-828.

25. Nnamchi CI, Obeta JAN, Ezeogu LI. Isolation and Characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int J Environ Sci Tech 2006; 3(2): 181- 190.
26. Kumara M, Leon V, De Sisto Materano A, Ilzins OA, Galindo-Castro I, Fuenmayor SL. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-Producing Pseudomonas sp. IR1. Z Naturforsch C 2006; 61(3-4): 203-212.
27. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresour Technol 2007; 98(7): 1339-1345. 28. Tahhan RA, Ammari TG, Goussous SJ, Al-Shdaifat HI. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by modified bioaugmentation sterategy. Int Biodeter Biodegr 2011; 65(1): 130-134.
29. Shahaliyan F, Safahieh A, Abyar H. Evaluation of emulsification index in marine bacteria Pseudomonas sp. and Bacillus sp. Arab J sci Eng 2015; 40(7): 1849-1854.
30. Wei YH1, Lai HC, Chen SY, Yeh MS, Chang JS. Biosurfactant production by Serratia marcescens SS-1 and its isogenic strain SMdeltaR defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. Biotechnol Lett 2004; 26(10): 799-802.