محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره۷۴، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۰
صفحه ۴۵۱ تا ۴۶۱

بررسی بهسازی زیستی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی جداشده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در حضور فنانترن

میثم پاشایی*[۱]؛ شهاب اوجانی

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- گروه شیمی و شیمی دارویی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

(تاریخ دریافت ۰۰/۰۲/۰۷-تاریخ پذیرش ۰۰/۰۷/۲۸)

چکیده:

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، یک گروه از آلاینده‌های محیطی در خاک هستند که به دلیل سمیت، اثرات موتاژن و کارسینوژن باعث نگرانی‌های زیادی در حوزه محیط زیست شده‌اند. از طرفی نیز فرآیند بهسازی زیستی به عنوان راهکاری شایسته برای بهسازی خاک‌های آلوده مورد توجه بسیاری از پژوهشگران و محققان قرار گرفته است. از این رو، هدف از پژوهش حاضر، جداسازی، شناسایی و ارزیابی توان رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی جدا شده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در حضور فنانترن در جهت بهسازی زیستی است. بدین منظور، در این مطالعه ابتدا ۲۵ نمونه خاک از عمق Cm ۳۵-۰ سانتی‌متری مناطق آلوده به مواد نفتی واقع در جنوب ایران (منطقه بوشهر) جمع‌آوری شد. سپس از نمونه‌های خاک در محیط‌های کشت مناسب، باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی شدند. در ادامه، باکتری‌های جداسازی شده با روش‌های بیوشیمیایی مانند (آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز) و همچنین روش‌های میکروبی از قبیل (رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور و ایجاد رنگ فلورسانس) شناسایی شدند. در این پژوهش، از بین ۶۰ باکتری تجزیه‌کننده مواد نفتی در حضور فنانترن، ۱۹ باکتری به نام‌های PDB 1-19 تعیین گردید. در نهایت، باکتری‌های *Chryseobacterium* spp PDB 19، *Sphingobacterium* spp PDB 8، *Acinetobacter johnsonii* PDB 13 و PDB 10 *Achromobacter xylosoxidans* به عنوان کارآترین باکتری‌ها انتخاب شدند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که با شناسایی و غربالگری باکتری‌های موثر و بهره‌گیری از توان میکروبی آن‌ها و ایجاد شرایط بهینه می‌توان در مقیاس صنعتی و کاربردی در جهت بهسازی زیستی خاک‌های آلوده به مواد نفتی اقدام کرد.

کلید واژگان: باکتری‌های تجزیه کننده، بهسازی زیستی، خاک، فنانترن

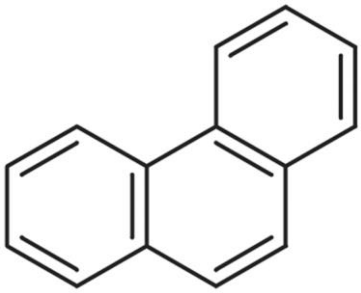
* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۲۴۷۶۵۷۵۲ ایمیل: pashaeemeysam@yahoo.com

۱. مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای[۱] یکی از آلاینده‌های عمده ژنوتوکسیک هستند که این دسته از مواد آلی، به عنوان عوامل آسیب زننده به DNA در موجودات شناخته شده‌اند (Martins, 2016). این آلاینده‌ها می‌توانند در هوا، آب و خاک وجود داشته باشند. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به طرق مختلف از جمله سوختن ناقص مواد آلی به محیط وارد می‌شوند (Finlayson-Pitts & Pitts, 1997). بیشترین مقدار هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به دلیل احتراق ناقص ترکیبات آلی طی روند فرآیندهای صنعتی و سایر فعالیت‌های انسان در محیط زیست آزاد می‌شود. PAHs جامداتی بی‌رنگ، سفید یا زرد کم‌رنگ با محلولیت کم در آب، نقطه ذوب و جوش بالا و فشار بخار کم هستند (Schoental, & Patnaik, 1964; Maskaoui *et al.*, 2002). در این دسته از ترکیبات با افزایش وزن مولکولی، محلولیت در آب کاهش می‌یابد و نقطه ذوب و نقطه جوش افزایش می‌یابد و همچنین فشار بخار نیز کمتر می‌شود و این مواد اغلب به عنوان ترکیبات میانجی در صنایع داروسازی (لوبریکانت)، صنایع کشاورزی و غیره کاربرد دارند (Klaassen *et al.*, 1996). PAHs به دلیل دارا بودن حلقه‌های بنزنی در ساختارشان، ترکیبات بسیار پایداری هستند و با افزایش تعداد حلقه‌های بنزن پایداری آن‌ها افزایش می‌یابد و به همین دلیل از این رو تجزیه زیستی آن‌ها به سختی انجام می‌شود (Bauer & Capone, 1985). فنانترن[۲] (شکل ۱) یکی از فراوان‌ترین PAHs در محیط است.

و به عنوان کوچک‌ترین هیدروکربن آروماتیک سه حلقه‌ای، دارای بخش‌های Bay – Region و K – Region می‌باشد. این بخش‌ها جایگاه‌های فعال مولکول جهت ایجاد مشتقات سرطان‌زا هستند. بنابراین از این رو این ماده به عنوان ترکیب مدل برای مطالعات متابولیسم PAHs سرطان‌زا به کار می‌رود. فنانترن در ساخت رزین‌ها و حشره‌کش‌ها نیز به کار می‌رود (Haritash & Kaushik, 2009; IARC, 2010). واکنش اصلی تجزیه زیستی فنانترن به وسیله آنزیم‌های دی اکسیژناز کاتالیز می‌شود و در این واکنش هر دو اتم اکسیژن مولکولی با هسته PAHs ترکیب می‌شوند و ترکیب Cis – Dihydrodiols را به وجود می‌آورند. (PAHs) می‌توانند ویژگی‌های سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا داشته باشند (Akhtar *et al.*, 1975; Jerina *et al.*, 1976) و نیز همچنین ممکن است در زنجیره غذایی و در بدن موجودات زنده تجمع پیدا کنند و به همین دلیل حضور آن‌ها در محیط نگران کننده است، چرا که راه اصلی جذب PAHs به بدن، جذب پوستی است (VanRooij *et al.*, 1993). شایان ذکر است در این راستا، فرآیند زیست‌پالایی[۳] تکنیکی است که می‌تواند آلاینده‌ها را به ترکیبات کم‌خطرتر یا بی‌خطر با مصرف ماده، انرژی و زمان کمتر نسبت به سایر روش‌های دیگر تبدیل کند (Ward *et al.*, 2003; Providenti *et al.*, 1993). به طور کلی روش‌های زیست‌پالایی شامل روش‌های اصلاح محیط از جمله به کارگیری مواد مغذی[۴]، هوادهی[۵] یا روش‌های افزودن تجزیه‌کننده

[۱] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
[۲] Phenathrene
[۳] Bio-remediation
[۴] Biostimulation
[۵] Biosparging



شکل ۱- ساختار شیمیایی فنانترن

مناسب[۶] است (Pinyakong *et al.*, 2003). زیست‌پالاییِ آلودگی‌ها و سرعت آن، به شرایط محیطی، تعداد و نوع میکروارگانیسم‌ها و طبیعت و ساختار شیمیایی ترکیبات تحت تجزیه بستگی دارد. بنابراین برای راه‌اندازی یک سیستم زیست‌پالایی، فاکتورهای متعددی باید در نظر گرفته شود. درباره توانایی باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت گسترده در خصوص توانایی‌شان در تجزیه آلاینده‌ها از جمله PAHs پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است. شدت و سرعت تجزیه زیستی به فاکتورهای متعددی از جمله pH، دما، اکسیژن، جمعیت میکروبی، درجه تجمع، دسترسی مواد غذایی، ساختار شیمیایی ترکیبات، ویژگی‌های انتقال مواد به سلول‌ها و نسبت مواد شیمیایی در محیط رشد بستگی دارد (Singh & Ward, 2004). بر اساس سایر مطالعات بر روی میکرارگانیسم‌های تجزیه‌کننده PAHs، اغلب باکتری‌های احیاءکننده نیترات و احیاءکننده سولفات، دارای قدرت تجزیه‌کنندگی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای هستند. راه‌های خنثی شدن آلودگی PAHs در محیط شامل اکسیداسیون نوری و شیمیایی، تبخیر، جذب سطحی روی ذرات خاک، تجمع در بدن موجودات زنده و تجزیه زیستی است که از این میان این روش‌ها، تجزیه زیستی به عنوان اصلی‌ترین راه تلقی می‌شود که در واقع این روش، به عنوان راه حلی برای خارج کردن آلودگی‌های PAHs از آب‌ها و خاک‌های آلوده به کار می‌رود چرا که دارای مزیت‌های اقتصادی فراوانی است (Gibson *et al.*, 1975; Zeng, 2000). در این راستا، مطالعات بر روی تجزیه زیستی به وسیله میکروارگانیسم‌ها می‌تواند در جهت پیشبرد استراتژی‌های زیست‌پالایی برای سمیت‌زدایی این مواد آلی بسیار مفید باشد. همچنین بهسازی زیستی نیز به عنوان راهکاری شایسته برای بهسازی خاک‌های آلوده مطرح شده است. در حقیقت بهسازی زیستی یک واژه‌ای همه‌گیر برای زدودن و کاهش آلودگی محیط زیست با فرآیندهای بیولوژیکی و به کمک ریز جانداران و به ویژه باکتری، قارچ و مخمر در آب‌ها و خاک‌های آلوده می‌باشد (Zongqiang *et al.*, 2007). در واقع خاک زیستگاه میکروارگانیسم‌های مختلف می‌باشد که با تغییر شرایط حاکم بر آن، توازن جامعه زیستی آن به هم می‌خورد و طبیعتا جمعیت گروهی که قادر به تحمل شرایط حاکم باشند بر دیگران فائق می‌آیند. بر این اساس می‌توان میکروارگانیسم‌هایی را جداسازی کرد که قادرند مواد نفتی را تجزیه نمایند. توان میکروارگانیسم‌ها از نظر تجزیه مواد نفتی یکسان نمی‌باشد. بنابراین جداسازی و خالص‌سازی این میکروارگانیسم‌ها و استفاده از سویه‌های توانمند در بهسازی زیستی، می‌تواند بسیار موثر و مفید باشد. در این راستا، این پژوهش با هدف جداسازی، شناسایی

[۶] Bioaugmentation

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت محیط CFMM

نوع مواد شیمیایی	مقدار (gr/L)
KH_2PO_4	۰/۸
Na_2HPO_4	۲/۲
NH_4NO_3	۳
$CaCl_2.\ 7H_2O$	۰/۰۰۵
$MgSO_4.\ 7H_2O$	۰/۰۱

و ارزیابی توان رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی جدا شده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در حضور فنانترن در جهت بهسازی زیستی انجام شد.

۲. مواد و روش ها

الف) نمونه‌برداری

در پژوهش حاضر، جامعه مورد بررسی، خاک‌های آلوده به مواد نفتی واقع در جنوب ایران (منطقه بوشهر) بوده است.

ب) جمع‌آوری نمونه

بدین منظور ۲۵ نمونه خاک از عمق ۳۵-۰ سانتی‌متری منطقه مذکور در ظروف درب‌دار شیشه‌ای و استریل شده جمع‌آوری گردید و سپس نمونه‌ها در کمتر از ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه تحقیقات انتقال یافتند.

ج) ساخت سوسپانسیون میکروبی

جهت ساخت سوسپانسیون میکروبی از محیط حداقل بدون کربن CFMM[۷] استفاده شد (جدول ۱). بدین ترتیب، ۱ گرم از خاک آلوده به مواد نفتی درون ۲۵ میلی‌لیتر از محیط CFMM در شرایط سترون درون ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری افزوده شد و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت با دور ۱۵۰ rpm انکوبه شد.

د) غنی‌سازی کشت میکروبی

بعد از ساخت سوسپانسیون میکروبی اولیه برای غنی‌سازی کشت میکروبی و جداسازی باکتری‌ها، مایه‌زنی ۵ میلی‌لیتر از محیط CFMM با ۲ درصد از ماده نفتی (فنانترن) انجام شد. در این مرحله شرایط و دمای انکوباسیون مشابه مرحله قبل بوده و فقط با این تفاوت که مدت زمان انکوباسیون به مدت ۱ هفته انجام گرفت. سپس با مشاهده تیرگی (کدورت) و رشد باکتری، برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی، اقدام به ساخت سری رقت از نمونه‌ها انجام گردید و پس از تهیه رقت‌های مناسب به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت‌های دارای محیط CFMM به همراه ماده نفتی فنانترن انتقال داده شد و سپس پلیت‌ها در طی ۳ هفته در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

ه) جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

با مشاهده رشد کلنی باکتری‌ها در درون پلیت‌ها و با توجه به ریخت‌شناسی کلنی باکتری‌ها و ویژگی‌هایی مانند شکل، کناره، خشکی و رنگ کلنی، اقدام به جداسازی باکتری‌های رشد یافته بر محیط CFMM شد. در جریان جداسازی باکتری‌ها و کشت آن‌ها از محیط نوترینت آگار استفاده شد و در پی آن از آزمون‌های (رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، آزمایش ساخت رنگ فلورسانس، آزمون اکسیداز و

[۷] Carbon Free Minimal Medium

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت محیط CFMM

باکتری (نام‌گذاری اولیه)	شناسایی (جنس یا گونه)	وضعیت رشد در حضور فنانترن
PDB1	*Stenotrophomonas spp.*	+++
PDB2	*Ralstonia spp.*	+++
PDB3	*Vibrio spp.*	–
PDB4	*Sphingobacterium spp.*	+++
PDB5	*Zymomonas spp.*	+++
PDB6	*Pseudomonas spp.*	–
PDB7	*Paracoccus spp.*	–
PDB8	*Sphingobacterium spp.*	+++
PDB9	*Panteao spp.*	–
PDB10	*Achromobacter spp.*	+++
PDB11	*Pseudomonas spp.*	–
PDB12	*Acinetobacter spp.*	+++
PDB13	*Acinetobacter spp.*	+++
PDB14	*Serattia spp.*	+++
PDB15	*Pseudomonas spp.*	–
PDB16	*Entrobacter spp.*	+
PDB17	*Pseudomonas spp.*	–
PDB18	*Pseudomonas spp.*	+++
PDB19	*Chryseobacterium spp.*	–

*:رشد خوب: +++ رشد ضعیف: + فاقد رشد: -

آزمون کاتالاز) جهت جداسازی و شناسایی استفاده شد.

ی) بررسی کارآیی در محیط کشت مایع

در این بخش جهت انجام آزمایش و داشتن کشت تازه، در ابتدا باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار کشت داده شدند. سپس از تک کلنی برای مایه‌زنی محیط نوترینت مایع استفاده شد. در ادامه، ۱ میلی‌لیتر از کشت مرحله قبل از باکتری رشد یافته را درون ویال ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و سپس در درون دستگاه سانتریفوژ قرار داده تا باکتری ته‌نشین شود. پس از ته‌نشینی، محلول رویی را دور ریخته و ته‌نشست باکتری را با حدود ۷۵۰ میکرولیتر محیط CFMM دوباره حل نموده و سپس به درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط CFMM دارای ۲ درصد فنانترن افزوده شد. برای بررسی کارآیی جدایه‌های باکتری در تجزیه زیستی فنانترن از محیط مایع دارای فنانترن استفاده شد. سپس تمامی ارلن‌ها بر روی دستگاه شیکر انتقال داده شدند و در زمان‌های (۰، ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت)، جمعیت و زمان رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

ز) آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به پژوهش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با بهره‌گیری از نرم‌افزار MSTATC تجزیه و تحلیل انجام پذیرفت. همچنین نمودارهای حاصله نیز از طریق نرم‌افزار

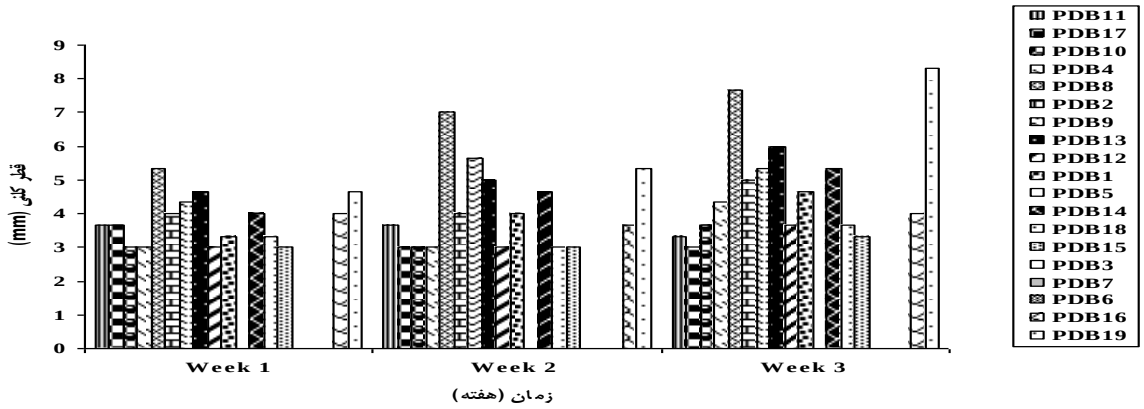
Excel ترسیم گردد.

۳. نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از ۶۰ نمونه خاک مربوط به خاک‌های آلوده به مواد نفتی منجر به شناسایی ۱۹ جدایه شد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ۱۹ باکتری با جنس و گونه متفاوت از قبیل *Stenotrophomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Vibrio* spp., *Zymomonas* spp., *Sphingobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Paracoccus* spp., *Panteao* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Entrobacter* spp., *Chryseobacterium* spp., و *Serattia* spp. شناسایی‌شده، از لحاظ شکل به صورت کوکو باسیل، کوکسی و باسیل، از لحاظ رنگ‌آمیزی گرم همه گرم منفی، بدون اسپور، کاتالاز مثبت و برخی از آن‌ها اکسیداز منفی و مثبت و همچنین تعدادی دارای توان ساخت رنگدانه در محیط King-B می‌باشند. به منظور غربالگری باکتری‌ها و انتخاب بهترین آن‌ها جهت تعیین وضعیت رشد جدایه‌های برتر در محیط جامد CFMM در حضور فنانترن مورد ارزیابی قرار گرفت و نتیجه مشاهده شده از رشد باکتری‌ها در حضور فنانترن در (جدول ۲) کاملا مشهود می‌باشد. از طرفی نیز پر واضح است که استفاده از روش سنجش قطر کلنی باکتری (یا تولید هاله شفاف) در انتخاب باکتری‌های کارآمد روشی مرسوم می‌باشد که ممکن است این روش در موارد مختلف استفاده شود (Ward *et al*., 2003). در این راستا، کارآیی ۱۹ جدایه باکتری در محیط کشت جامد در حضور فنانترن در طی زمان‌های مختلف بررسی و نتایج آن در (شکل ۲) آورده شده است. همچنین کارآیی ۱۹ جدایه باکتری در محیط مایع نیز در حضور فنانترن در طی زمان‌های (۰، ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴) ساعت صورت گرفت. در ادامه، جهت بررسی تجزیه فنانترن بر حسب دو فاکتور جمعیت باکتری و زمان رشد باکتری از روش دانکن استفاده شد و مقایسه میانگین نتایج نشان می‌دهد که در بررسی اثر زمان، بیشترین میانگین مربوط به زمان دوم با تجزیه فنانترن بیشتر و کمترین مقدار مربوط به زمان اول و چهارم با تجزیه فنانترن کمتر می‌باشد (جدول ۳). بر همین اساس، به نظر می‌رسد که رشد باکتری در اوایل، سیر صعودی به خود می‌گیرد، ولیکن در ادامه، شرایط برای زنده ماندن باکتری مهیا نبوده و به دلیل اثر برخی از عوامل، جمعیت آن افت پیدا می‌کند (شکل ۳).

۴. بحث و نتیجه گیری

روش‌های زیستی برای حذف آلاینده‌های هیدروکربنی نفت از مناطق آلوده به مواد نفتی به دلیل تولید نکردن آلاینده‌های ثانویه، هزینه کمتر و کارآیی بیشتر نسبت به روش‌های فیزیکوشیمیایی در کانون توجه هستند. از این رو، آنچه فرآیند اصلاح زیستی را به فرآیندی بسیار مهم در عرصه حفاظت محیط زیست تبدیل می‌کند، استفاده از ریز موجودات بومی برای مناطق آلوده به مواد نفتی است. بنابراین جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی و تجزیه‌کننده مواد نفتی مناطق مذکور امری بسیار ضروری است. تجزیه زیستی، در واقع شکسته شدن مواد پیچیده به مواد ساده نظیر دی‌اکسید کربن، آب و بیوماس سلولی به وسیله میکروب‌هاست. به طور برجسته، تجزیه زیستی نفت خام و ترکیبات نفتی در محیط‌های آبی و خاکی به وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام می‌گیرد (Saleh *et al*., 2003). تعداد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن در مکان‌های آلوده به نفت خام به طور چشمگیری



شکل ۲- سنجش قطر کلنی باکتری‌ها در حضور فنانترن در محیط جامد (اثر باکتری در زمان)

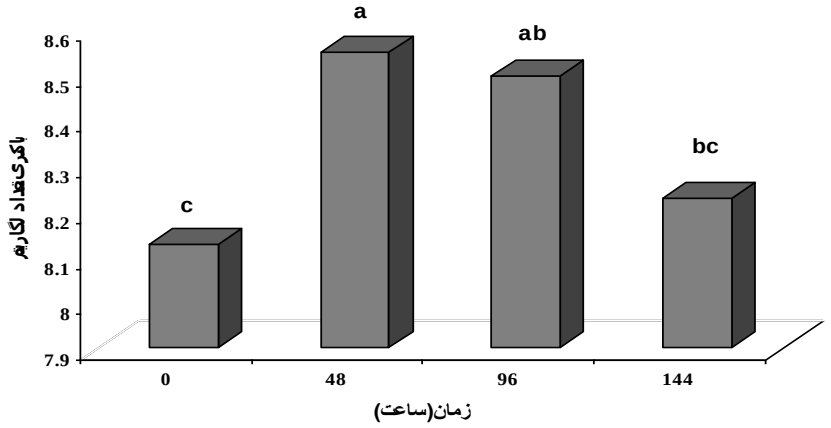
جدول ۳- مقایسه میانگین از لحاظ تجزیه فنانترن بر حسب باکتری و زمان

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
باکتری	۱۸	۲۴۶/۴۴۲	۱۳/۶۹۱	۲۸/۳۵۲۷**
زمان	۳	۳۸/۳۷۳	۱۲/۷۹۱	۲۶/۴۸۸۵**
باکتری×زمان	۵۴	۱۵۸/۹۷۵	۲/۹۴۴	۶/۰۹۶۶**
خطا	۷۶	۳۶/۶۹۹	۰/۴۸۳	
جمع	۱۵۱	۴۸۰/۴۸۹		

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

افزایش می‌یابد (Rojo, 2009). همچنین خط ساحلی به طور خاص در برابر ریزش‌های نفتی آسیب می‌بیند. جوامع میکروبی دارای تنوع بالا با روش‌های متابولیکی متفاوت می‌باشند که در عمق چند میلی‌لیتری آب و خاک قرار گرفته‌اند و هر یک از آن‌ها می‌توانند در ابتدا با پتانسیل زیادی برای تجزیه زیستی نفت خام مورد توجه قرار گیرند (Lliros *et al.*, 2008). به دلیل استفاده از توانمندی تجزیه زیستی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی در اصلاح ریزش‌های نفتی، شناسایی این باکتری‌ها در محیط‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (Abed *et al.*, 2005). از این رو، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی مختلف به وسیله محققان و پژوهشگران زیادی در سرتاسر دنیا مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته شده است که در اینجا به برخی از آن‌ها می‌پردازیم که در بسیاری از آن‌ها نمونه‌های موثر در تجزیه مواد نفتی با نمونه‌های باکتریایی که در این آزمایش خالص‌سازی و شناسایی شده هماهنگی دارد. در طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۹ از فنانترن به عنوان منبع کربن برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده PAHs در مکان‌های آلوده به مواد نفتی استفاده نمودند و موفق به شناسایی چند سویه باکتری به نام‌های *Escherichia coli*، *Alcaligenes* sp. و ... شدند (Am-Euras *et al.*, 2009).

شایان ذکر است که در طی مطالعه‌ای که مربوط به تحقیقی درباره بررسی مدل تجزیه زیستی فنانترن



شکل ۳- مقایسه میانگین رشد باکتری‌ها در محیط مایع در حضور فنانترن براساس (فاکتور زمان)

در خاک‌های آلوده به مواد نفتی به وسیله *Acinetobacter*، پرداخته شده بود در ابتدا خاک آلوده به ترکیبات نفتی باکتری‌های مستعد تجزیه‌کننده PAHs جداسازی شدند و سپس قابلیت آن‌ها در تجزیه زیستی فنانترن در محیط دوغابی بررسی گردید. با استفاده از *Acinetobacter* که بیشترین توانایی را در حذف فنانترن داشت، مدل تجزیه زیستی در خاک در مقیاس آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که میزان حذف فنانترن به غلظت اولیه آلودگی بستگی دارد و با افزایش غلظت اولیه، نرخ حذف فنانترن افزایش می‌یابد و همچنین با تقریب مناسبی می‌توان گفت که حذف فنانترن از مدل سنتیک درجه صفر و یک پیروی می‌کند (Rezaei *et al*., 2009). شایان ذکر است که بررسی تاثیر عوامل محیطی در موفقیت پاکسازی زیستی آلاینده‌های نفتی، وابسته به توانایی ایجاد و حفظ شرایطی است که در نهایت افزایش میزان تجزیه زیستی در محیط‌های آلوده شده را به همراه داشته باشد (Vidali, 2001). از طرفی نیز عوامل محدودکننده متعددی روش حذف بیولوژیکی آلاینده‌ها به وسیله میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و کارآیی این روش را قدری محدود می‌کند. برخی از این عوامل محدودکننده عبارت است از غلظت آلاینده، دسترسی به مواد آلاینده، شرایط مناسب برای بقا و رشد میکروارگانیسم از جمله (pH، دمای مناسب، رطوبت مناسب، اکسیژن کافی، مواد غذایی مناسب و عدم وجود مواد سمی و کشنده میکروارگانیسم‌ها) که به دلیل حائز اهمیت بودن آن‌ها مطالعات متعددی نیز در این زمینه انجام شده است (Östberg *et al*., 2007). تاکنون تعداد زیادی از باکتری‌هایی که قادرند گازوئیل را تجزیه کنند، از خاک‌های آلوده جداسازی شده‌اند. به طور مثال دو جنس باکتریایی *Micrococcus* و *Pseudomonas* از گاراژ ماهاراشترا در هند جداسازی شده است. در این بررسی، سرعت تجزیه زیستی هر یک از جنس‌ها بدست آمد و نشان داده شد که سرعت تجزیه زیستی حالت مخلوط این دو جنس باکتری از حالت منفرد آن‌ها بیشتر است (Nikhi, 2013). در پژوهش دیگری که در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده گازوئیل از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان خوزستان،انجام شده بود نتایج حاصل از آن نشان داد که باکتری‌های تجزیه‌کننده گازوئیل در خاک‌های آلوده در ایران از تنوع مناسبی برخوردار هستند و

پتانسیل استفاده در حذف آلودگی گازوئیلی از خاک را دارند (Hasanshahian, 2016). همچنین سویه‌های *Bacillus polymyxa*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus Licheniformis* و *Pseudomonas pseudomallei* را به عنوان سویه‌های برتر تولیدکننده بیوسورفاکتانت تجزیه‌کننده نفت خام، از جنگل‌های حرای دریای سرخ جداسازی نمودند (Bayoumi, & El-Nagar 2009). در این راستا پژوهشگرانی به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های *Pseudomonas stutzeri* و *Pseudomonas aeruginosa* توانایی تجزیه زیستی فنانترن و باکتری‌های *Stenotrophomonas maltophilia* و *Pseudomonas alcaligenes* توانایی تجزیه فلورانتن را دارند (Liangli & Hungchen 2009). در همین راستا، نتایج حاصل از بررسی تجزیه فنانترن بر حسب دو فاکتور جمعیت باکتری و زمان رشد باکتری در پژوهش حاضر نشان داد که در رابطه با اثر زمان، بیشترین میانگین مربوط به زمان دوم با تجزیه فنانترن بیشتر و کمترین مقدار مربوط به زمان اول و چهارم با تجزیه فنانترن کمتر می‌باشد و به نظر می‌رسد که رشد باکتری در اوایل، سیر صعودی به خود می‌گیرد و در ادامه به دلیل اثر برخی از عوامل، جمعیت آن افت پیدا می‌کند که با نتایج هوانگ و همکارانش مطابقت دارد(Hwang, 2002). لازم به ذکر است که در این راستا، نکته حائز اهمیت این است که یک رابطه آشکار بین فعالیت امولسیون‌کنندگی، چسبندگی سلولی به هیدروکربن و سرعت رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در محیط نفت خام وجود دارد (Hassanshahian *et al*., 2010). با توجه به بررسی نتایج انجام شده در پژوهش حاضر، از بین ۶۰ باکتری تجزیه‌کننده مواد نفتی در حضور فنانترن، ۱۹ باکتری تعیین و در نهایت، باکتری‌های *Chryseobacterium* spp ، *Sphingobacterium* spp.، *Acinetobacter johnsonii* و *Achromobacter xylosoxidans* به‌عنوان کارآترین باکتری‌ها انتخاب شدند. بنابراین می‌توان گفت ایجاد دانش در خصوص نقش عوامل مختلف در بهسازی آلاینده‌های نفتی و درک بهتر نقش جوامع میکروبی موجود در مکان‌های آلوده، دیدگاه روشنی برای بهره بردن از باکتری‌های ساکن در این محیط‌ها ایجاد می‌کند. از این رو، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر در مجموع به طور کلی می‌توان گفت اولین گام در بهره گرفتن از توان میکروبی خاک برای بهسازی زیستی آلاینده‌های آلی، غربالگری و شناسایی آن‌هاست که در این بررسی، ۱۹ باکتری گرم منفی، فاقد اسپور شامل جنس‌ها و گونه‌های مختلف از خاک‌های آلوده به مواد نفتی استان بوشهر جداسازی شدند که با توجه به نتایج حاصل از پژوهش می‌توانند آن‌ها را به عنوان گزینه مناسبی به منظور زیست‌پالایی محیط آلوده به نفت خام معرفی گردند و در نهایت بتوان از این فن‌آوری بهسازی زیستی به منظور حذف آلودگی‌های نفتی در این منطقه و مناطق مشابه بهره جست. البته شایان ذکر است که برای بررسی دقیق‌تر استفاده از روش‌های مولکولی نیز پیشنهاد می‌گردد.

References

Abed RMM, K.J., 2005. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. International Biodeterioration & Biodegradation 55, 29-37.

Akhtar, M.N., Boyd, D.R., Thompson, N.J., Koreeda, M., Gibson, D.T., Mahadevan, V., 1975. Absolute stereochemistry of the dihydroanthracene-cis-and trans-1, 2-diols produced from anthracene by mammals and bacteria. Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1(23), 2506-2511.

Am-Euras. 2009. Isolation and Identification of Three-Rings Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) Degrading Bacteria. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 5(1), 31-38.

Bauer, J.E., Capone, D.G., 1985. Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. Applied and Environmental Microbiology 49(4), 828-835.

Bayoumi, R.A., El-Nagar, A.Y., 2009. Safe control methods of petroleum crude oil pollution in the mangrove forests of the Egyptian Red Sea coast. Journal of Applied Sciences Research 5(12).

Clar, E., Schoental, R., 1964. Polycyclic hydrocarbons (Vol. 2, pp. 42-45). New York: Academic Press.

Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. Science 27 (5315), 1045-1051.

Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yogi, H., Yeh, H., 1975. Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. Science 189 (4199), 295-297.

Haritash, A., Kaushik, C., 2009. Biodegradation aspects of polycyclicaromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of Hazardous Materials 169(1), 1-15.

Hassanshahian, M.E.G., Kermanshahi, R., Cappello, S.. 2010. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. Soil and Sediment Contamination 19(3).

Hassanshahian, M., 2016. Isolation and characterization of diesel-oil degrading bacteria from petroleum contaminated soil at Khozestan provenance. Biological Journal of Microorganism 5 (19).

Hwang, S., Cutrigh,t T.J., 2002. Biodegradiation of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. Chemosphere 47(9), 891-899

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to HumansIngested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. 2010 .IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

Jerina, D., Selander, H., Yagi, H., Wells, M.C,, DaveyM J,, MahadevanM V., 1976. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. Journal of the American Chemical Society 98(19), 5988-5996.

Klaassen, C.D., Amdur, M.O., 1996. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8th ed. United States. 1454.

Liangli, J., Hungchen, B., 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials. 2009, 2.

Lliros, M., Gaju, N., Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Esteve, I., Martinez-Alonso, M., 2008. Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. Science of the Total Environment 393, 39-49.

Martins, M., Ferreira, A,M., Costa, M.H., Costa, P.M.و 2016. Comparing the genotoxicity of a potentially carcinogenic and a noncarcinogenic PAH singly, and in binary combination, on peripheral blood cells of the European sea bass. Environmental Toxicology 31(11), 1307-1318.

Maskaoui, K., Zhou, J., Hong, H., Zhang, Z., 2002. Contamination by polycyclic aromatic

hydrocarbons in the Jiulong River estuary and Western Xiamen Sea, China. Environmental Pollution 118(1), 109-122.

Nikhi, T.D.V., Nikhit, D.V., Rohan, G., Satish, B., 2013. Characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. international research Journal of Environment Sciences 2(2), 48-52.

Östberg, T.L., Jonsson, A.P., Bylund, D., Lundström, U.S., 2007. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. International Bio deterioration and Biodegradation 60, 334-341.

Patnaik, P., 1964. A comprehensive guide to the properties of hazardous chemical substances. 3rd Edition Ed.

Providenti, M.A., Lee, H., Trevors, J.T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journal of industrial Microbiology 12(6), 379-395.

Pinyakong, O., Habe, H., Omori, T., 2003. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The Journal of General and Applied Microbiology 49(1), 1-19.

Rezaei, K. R. Joneidy, J.A., 2013. Survey of Phenantherene Biodegradationís Model in Contaminated Soils by Acinetobacter SP. Iranian Journal of Health and Environment 2(3), 196-203.

Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. Environmental Microbiology 11(10), 2477-2490.

Saleh, A.B., Ghazali, F.M., Abdrahman, R.N.Z., Basri, M., 2003. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollutionIndian Journal of Biotechnology 2, 411-425.

Singh, A., Ward, O.P., 2004. Biodegradation and Bioremediation, 1 ed. Soil Biology (SOILBIOL, volume 2). Berlin, Heidelberg. 2004, 309.

VanRooij, J., Bodelier-Bade, M.M., Jongeneelen, F.J., 1993. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. Occupational and Environmental Medicine 50(7), 623-632.

Vidali, M., 2001. Bioremediation: An Overview. Pure and Applied Chemistry 7, 1163-1172.

Ward, O., Singh, A., Van Hamme, J., 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30(5), 260-270.

Zeng, Y., Hong, P.A., Wavrek, D.A., 2000. Integrated chemical-biological treatment of benzo [a] pyrene. Environmental Science & Technology 34(5), 854-862.

Zongqiang, G.K., Berndt-Michael, A., Peijumli, W., 2007. Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. Journal of Hazardous Material 143(2), 372-37.