تجزیه زیستی بعضی از هیدروکربن های آروماتیک نفتی خطرناک در محیط زیست جنوب غرب ایران به وسیله مخلوطی از گونه‌های باکتری استخراج شده از خاک‌های آلوده در تالاب شادگان

امیر حسین چرخابی، سید عباس شجاع السادات، پرویز شفیعی و نرگس نادیان

به ترتیب استادیار مرکز تحقیقات حفاظت خاک و آبخیزداری، استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشجوی دکتری و کارشناس بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

یکی از خطرناکترین آلاینده‌های آب، هوا و خاک هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای می‌باشند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که فعالیتهای صنعتی انسان، تنها عامل آلودگی محیط زیست به ترکیبات سمی و خطرناک به وسیله این دسته از آلاینده‌ها می‌باشد(۲). هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای در طی فرآیند احتراق سوختهای فسیلی، بویژه در مراکز صنعتی، تولید و در محیط زیست پراکنده می‌شوند. تأسیسات میعان سازی ذغال سنگ از عمده‌ترین منابع مولد این ترکیبات می‌باشد(۶). هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای پس از تولید، جذب سطوح ذرات معلق هوا و یا ذرات خاک می‌شوند و با گذشت زمان به آبهای زیرزمینی نفوذ کرده و در محیط زیست منتشر می‌شوند.

حضور هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای در محیط زیست یک تهدید جدی برای سلامتی انسان و حیات وحش می‌باشد. سرطانزائی بعضی از این ترکیبات، مانند ترکیب بنزوپایرن که از پنج حلقه بنزنی تشکیل شده است، به اثبات رسیده است(۶). آنزیم های ترشح شده از جگر پستانداران باعث اکسیده شدن برخی از هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای شده و ماده حاصل پس از تشکیل پیوند کووالانسی با بازهای رشته DNA باعث بروز موتاسیون (جهش ژنتیکی) و در نهایت، سرطان خواهد شد(۵). به همین علت پاکسازی مکان های آلوده از این ترکیبات بسیار حائز اهمیت و مورد توجه سازمانهای محیط زیست قرار دارد. سازمان محیط زیست ایالات متحده لیستی از ۲۰۰ ترکیب خطرناک و مورد اولویت پاکسازی ارائه نموده است که در آن ۱۶ ترکیب از دسته هیدروکربنهای آروماتیک چندحلقه‌ای نیز قرار دارد (۲).

زیست سالم سازی یکی از فن‌آوری‌های رایج در پاکسازی و مداوای خاک های آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای می‌باشد. فن‌آوری زیست سالم سازی تاکنون در بسیاری از مکان های آلوده به کارگرفته شده است(۹). نتایج موفقیت‌آمیز این روش در پاکسازی خاکهای آلوده ناشی از حادثه نفتی اگزون‌والدز باعث شد که زیست سالم‌سازی به عنوان یک روش کم هزینه و مؤثر مورد توجه سازمانهای محیط زیست قرار بگیرد(۱۱). مبنای این روش بیولوژیکی عملکرد ریزسازواره‌ها، به منظور تجزیه ترکیبات آلاینده می‌باشد. تاکنون تعداد بسیار زیادی از باکتری ها با توان تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک دو، سه و چهارحلقه‌ای به عنوان تنها منبع کربن و انرژی شناخته و جداسازی شده‌اند(۸). توسعه و گسترش در بکارگیری این فن‌آوری، مستلزم کنترل فعل و انفعالات پیچیده میکروبی در برای تجزیه ترکیبات آلاینده و تسریع فرآیند پاکسازی می‌باشد. هدف بسیاری از مطالعات اخیر در این راستا و به منظور بررسی عوامل بازدارنده در فرآیندهای تجزیه هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای به وسیله باکتریها بوده است(۵).

در این تحقیق تاثیر تعداد حلقه‌های بنزنی موجود در این ترکیبات در فرایند تجزیه زیستی، مورد بررسی و هیدروکربن های آروماتیک منتخب حاوی سه و چهار حلقه بنزنی می‌باشند. باکتری های مورد

آزمایش از گونه‌های مختلف و از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی تالاب شادگان جداسازی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

فنانترن، آنتراسن، فلورن، پایرن و فلورانتن با خلوص بیش از ۹۸٪ ، حلال دی‌کلرومتان، آب یونیزه شده و نوترینت آگار از شرکت مرک حلالهای استونیتریل و استون از آکروس و کلیه مواد مورد استفاده در تهیه محیط کشت پایه معدنی از شرکت فلوکا تهیه شدند.

نمونه‌برداری از خاک

نمونه‌برداری خاک از مناطق آلوده به ترکیبات نفتی تالاب شادگان انجام شد. در این موارد هنگام نمونه‌برداری توجه به سابقه آلودگی در محل، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. زیرا معمولا حضور طولانی‌تر ترکیبات هیدروکربنی در خاک منجر به سازگاری بیشتر باکتری های تجزیه کننده با ترکیبات آلاینده خواهد شد. لذا با بررسی‌های انجام شده در مکان های مختلف تالاب، ۶ منطقه به عنوان ایستگاه‌های نمونه‌برداری انتخاب شدند. در این نواحی انبوهی از لکه‌های نفتی از دریا به حاشیه تالاب منتقل شده بود که بر سطح خاک بوضوح قابل رؤیت بودند. در این نقاط از عمق ده تا ۲۰ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری شد. نگهداری از نمونه‌های خاک با استفاده از ظروف در بسته شیشه‌ای انجام شد و نمونه‌های جمع آوری شده پس از کدگذاری و زدن برچسب، در مجاورت تکه‌های یخ بسته‌بندی شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی گونه‌های باکتریایی

شش گونه باکتریایی با انجام یکسری آزمایش‌های غنی‌سازی که در آن خاک آلوده بعنوان منبع میکروبی در نظر گرفته شد، جداسازی و سپس خالص سازی گردید. به منظور شروع مرحله غنی‌سازی ۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از فنانترن در فلاسک های ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد(۳). نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از تالاب شادگان با یکدیگر مخلوط شد و ۲۰ گرم از آن که حاوی انواع باکتری‌های سازگار با محیط‌های هیدروکربنی بود، بعنوان منبع میکروبی به محیط کشت هر یک از فلاسک ها اضافه شد. فلاسکها بر روی هم زن با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته در تاریکی گرماگذاری گردید. پس از گذشت یک هفته، ۱۰ درصد از حجم محیط کشت قبلی به محیط کشت تازه اضافه شد(۷). با ادامه آزمایش‌های غنی‌سازی به مدت یکماه، جمعیت باکتری های سازگار شده با فنانترن افزایش یافت. اکنون می‌بایست از میان باکتری های موجود، گونه‌های قادر به تجزیه فنانترن جداسازی و سپس خالص سازی می‌شد.

جداسازی گونه‌های تجزیه‌کننده فنانترن به روش کیوهارا انجام شد (۱۲). مطابق این روش، ابتدا محیط کشت جامد آگار در تعدادی از بشقابک‌های شیشه‌ای تهیه شد. محیط کشت جامد با اضافه کردن ۲۰ گرم آگار به محیط کشت پایه معدنی تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاصل از انتهای مرحله غنی‌سازی به بشقابک های شیشه‌ای منتقل شد و بوسیله میله شیشه‌ای سرکج بر سطح جامد آگار گسترده شد. اکنون مقداری از محلول ۵٪ فنانترن در استن که قبلا تهیه شده بود بر روی سطح بشقابک‌ها اسپری شد. پس از تبخیر استن، سطح محیط جامد آگار شیری رنگ شد. بشقابک ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت کلنی‌های باکتریایی تشکیل شد و بر روی سطح جامد آگار بوضوح قابل رؤیت بودند. تشکیل هاله روشنی در اطراف کلنی برخی از باکتری‌ها نشان دهنده قدرت تجزیه فنانترن توسط گونه‌های مورد نظر بود(۱و۳ و۸ و۹). شش کلنی حاوی هاله روشن با روش کشت متوالی بر روی بشقابک و رعایت شرایط استریل، خالص سازی گردید. کلنی‌های خالص سازی شده بمنظور انجام آزمایش‌های تشخیص جنس و شناسائی به بخش میکروبیولوژی دانشگاه تهران منتقل شدند.

تجزیه زیستی هیدروکربنهای آروماتیک چندحلقه‌ای

به منظور بررسی توان تجزیه زیستی هیدروکربنهای آروماتیک چندحلقه‌ای به وسیله مخلوط گونه‌های باکتریایی، ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه معدنی در فلاسک های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. غلظت هر یک از هیدروکربن های آروماتیک فنانترن، آنتراسن، فلورن، پایرن و فلورانتن در فلاسک های ۵۰۰ میلی‌لیتری به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر رسانده شد. به منظور جلوگیری از کلوخه شدن هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای، پنج ترکیب مورد نظر ابتدا در استون حل و سپس به محیط کشت اضافه شد(۱۰). فلاسک های ۵۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۲۴ ساعت بر روی هم‌زن قرار داده شد تا استون از محیط کشت خارج شود. در شرایط کاملا استریل، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی مخلوط شش گونه باکتریایی که در محلول فسفات تهیه شده بود، به هر فلاسک تلقیح شد. فلاسک ها پس از برچسب زدن و کدگذاری در تاریکی و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بر روی هم‌زن با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند(). برای هر آزمایش ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد. در مرحله استخراج هر ۱۰ ساعت ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت یک فلاسک برداشته و در لوله آزمایش ۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد. به هر لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتر هگزان و ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان بعنوان حلال استخراجی اضافه شد(۷). لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت بر روی هم‌زن دوار قرار داده شد تا ترکیبات هیدروکربنی از فاز آبی به فاز آلی انتقال یابند. آنالیز کمی میزان آلایندهٔ موجود در فاز آلی به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع انجام شد.

آنالیز کروماتوگرافی مایع

آنالیز کمی هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) آزمایشگاه بیوتکنولوژی صنعتی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. این دستگاه مدل یانگلین[8] می‌باشد که مجهز به سیستم پمپ مدل ۹۰۱۲ و دتکتور UV مدل

8- Yanglin

۹۰۵۰ می‌باشد. نرم افزار مورد استفاده آتوکروم۲ نسخه ۴/۲ بود. حلالهای مورد استفاده در فاز متحرک، شامل ترکیب ثابتی از آب یونیزه و استونیتریل، با نسبت حجمی ۲۰ به ۸۰ بود. ابتدا دستگاه با تزریق محلول های استاندارد پنج هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای کالیبره شد و سپس نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرحله استخراج، برای تعیین غلظت، به دستگاه تزریق شد. هر تزریق با استفاده از سرنگ هامیلتون ۱۰۰ میکرولیتری و به میزان ثابت ۲۰ میکرولیتر انجام شد. زمان تکمیل هر کروماتوگرام حداکثر برابر ۲۰ دقیقه بود. نرم افزار دستگاه با مقایسه پیک های استاندارد و پیک های نمونه‌های مجهول و بر مبنای نسبت مساحت‌ها، غلظت ماده مجهول را محاسبه می‌نمود.

نتایج و بحث

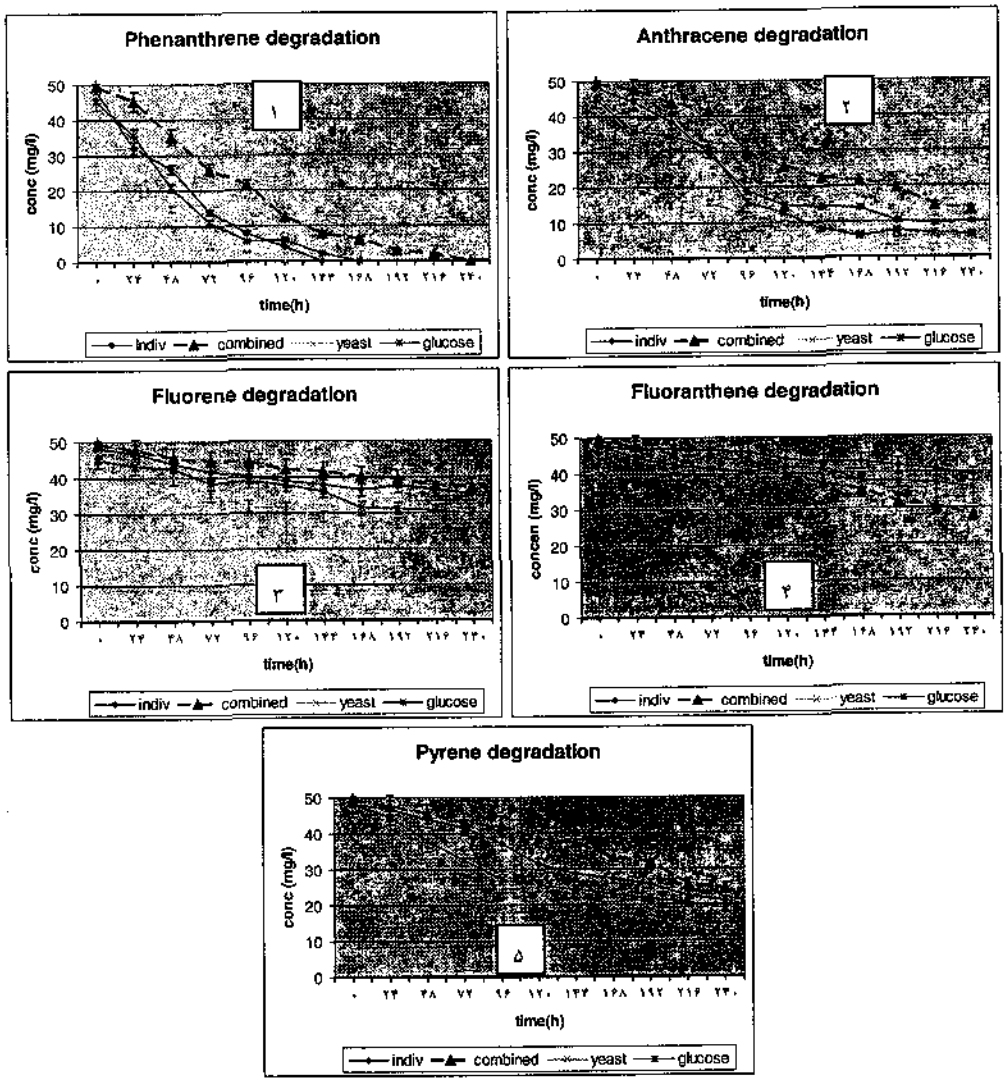
گام نخست در راستای پاکسازی خاک های آلوده با استفاده از روش زیست سالم سازی، جداسازی باکتری های تجزیه‌کننده ترکیبات آلاینده می‌باشد. سپس بررسی سرعت تجزیه ترکیبات دارای وزنهای مولکولی (تعداد حلقه‌های بنزنی) متفاوت، به همراه شناخت عوامل بازدارنده در طی فرآیندهای تجزیه، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. معمولا مکان های آلوده به هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای شامل مخلوطی از انواع مختلف این ترکیبات بوده و موفقیت در پاکسازی این مناطق مستلزم تجزیه باکتریایی طیف گسترده‌ای از ترکیبات آلاینده می‌باشد. نتایج آنالیزهای انجام شده توسط یو۳ و همکارانش نشان دهنده حضور ۱۲۰ نوع مختلف از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های خاک یکی از مناطق آلوده می‌باشد(۳). میزان زیست تخریب پذیری۴ هیدروکربنهای آروماتیک چندحلقه‌ای۵ توسط مخلوط گونه‌های باکتریایی در شرایط هوازی و ارتباط آن با تعداد حلقه‌های بنزنی یا وزن مولکولی در اینجا بررسی شد. پنج هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای منتخب عبارتند از فنانترن۶ آنتراسن۷ و فلورن۸ (حاوی سه حلقهٔ بنزنی) و پایرن۹ و فلورانتن۱۰ (حاوی چهار حلقهٔ بنزنی). شش گونهٔ باکتریایی از خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی در تالاب شادگان با انجام یکسری آزمایش‌های غنی‌سازی با حضور فنانترن به عنوان تنها منبع کربن و ژی در محیط کشت، جداسازی شدند. نتایج شناسایی جنس باکتری ها نشان داد که آن ها از گونه‌های سودوموناس۱۱ مایکوباکتریم۱۲، دینوکوکوس۱۳، ایکنلا۱۴، اولی‌ژلا۱۵ و کورینه باکتریم۱۶ می‌باشند. کلیهٔ آزمایش های تجزیه زیستی در محیط کشت مایع انجام شد. غلظت پنج هیدروکربن حلقوی در محیط کشت باکتریایی، به طور جداگانه، برابر ۵۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفت. مخلوط گونه‌های باکتریایی در مدت ۶ روز (۱۴۴ ساعت) فنانترن را به طور کامل تجزیه نمودند، در حالی که آنتراسن، فلورن، پایرن و فلورانتن پس از گذشت ۱۰ روز (۲۴۰ ساعت) به ترتیب به میزان ۷۸٪، ۶۴٪، ۳۰٪ و ۱۸٪ تجزیه شدند. مشابه این نتایج در تحقیقات انجام شده توسط بوئر[۱۷]، ال‌مندورف[۱۸]، هیت‌کمپ[۱۹]، هربز[۲۰]، پارک[۲۱] و گروسر[۲۲] نیز بدست آمده است(۵ و۶ و۷ و۸ و۹ و۱۰). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که میزان زیست تخریب‌پذیری هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای ارتباط معکوس با افزایش تعداد حلقه‌های بنزنی در این ترکیبات دارد و در نتیجه با افزایش تعداد حلقه‌های بنزنی پایداری این ترکیبات در محیط زیست افزایش می‌یابد.

بسیاری از مطالعات اخیر با هدف بررسی علت اصلی وجود تفاوت در سرعت تجزیه زیستی ترکیبات حاوی حلقه‌های بنزنی متفاوت انجام شده است. برخی از مطالعات انجام شده، عملکرد متفاوت باکتری ها بر روی ترکیبات مختلف آلاینده را علت اصلی وجود تفاوت در سرعت تجزیه این ترکیبات می‌داند. در این تحقیقات به مسیرهای بیوشیمیایی تجزیه و وجود سیستم های آنزیمی مختلف در باکتری ها اشاره شده است(۱).

نتیجه کلی که در شکل های (۱) تا (۵) نشان داده شده است، بیانگر تاثیر تعداد حلقه‌های بنزنی و آرایش آن ها بعنوان یکی از مهم ترین عوامل تعیین کننده در فعل و انفعالات پیچیده میکروبی و سرعت تجزیه ترکیبات آلاینده می‌باشد. بررسی دقیقتر تاثیر تعداد حلقه‌های بنزنی بر سرعت تجزیه، مستلزم شناخت سیستم آنزیمی تجزیه کننده ترکیبات و همچنین پیوندهای مورد تهاجم و بطور کلی شناخت مسیر بیوشیمیایی طی شده در طول فرآیند تجزیه می‌باشد. درک عوامل مؤثر در سرعت تجزیه زیستی ترکیبات آلاینده، کلید موفقیت در کنترل و افزایش سرعت پاکسازی خاکهای مناطق آلوده به ترکیبات هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای با استفاده از روش زیست سالم سازی می‌باشد.

9- Autochrom
10-Yu
11- Biodegradation
12- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
13- Phenanthrene
14- Anthracene
15- Fluorene
16- Pyrene
17- Fluoranthene
18- *Pseudomonas*
19- *Mycobacterium*
20- *Dienococcus*
21- *Eikenella*
22- *Oligella*
23- *Corynebacterium*

24- Bauer
25- Elmendorf
26- Heitkamp
27- Herbes
28- Park
29- Grosser



شکل (۱) تا (۵) زیست تخریب پذیری ۵ هیدروکربورانتخابی در مجاورت باکتریهای مختلف غنی شده با یست و گلوکز استخراج شده از خاک های آلوده تالاب شادگان در خوزستان.

منابع مورد استفاده

1- Bauer, J.E. and D.G. Capone. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. Applied Environmental Microbiology, 54:1649-1655.

2- Elmendorf, D.L., C.E. Haith, G.S. Douglas, R.C. Prince. 1994. Relative rates of biodegradation of substituted polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hinchee, R.E., Leeson, A., Semprini, L., Ooong, S.K. (Eds.), Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 188-202.

3- Fu, G., A.T. Kan and M. Tomson. 1994. Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. Environmental Toxicology Chemistry, 13: 1559-1567.

4- Geurin, W.F., S.A. Boyd. 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species, Applied Environmental Microbiology, Vol. 58, pp 1142-1152.

5- Grosser, R.J., D. Warshawsky and J.R. Vestal. 1995. Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. Environmental Toxicology Chemistry Vol. 14, pp 375-382.

6- Heitkamp, M.A., C.E. Cerniglia. 1987. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. Environ. Toxicol. Chem, 6: 535-546.

7- S.E., Herbes, L.R. Schwall. 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-coking wastewater discharge. Applied Environmental Microbiology, 35: 306-316.

8- Kastner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and

pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil, Applied Environmental Microbiology, 64: 359–362.
9- Leblond J.D., T.W. Schultz and G.S. Sayler. 2001. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures, Chemosphere, Vol. 42, pp 333-343.
10- Lethomaki and Niemela, 1975.
11- Mlynarz, D., O.P. Ward. 1995. Degradation polycyclic aromatic hydrocarbons PAHs by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH contaminated soil, Canadian J. Microbiology, 41: 470-476.
12- Park, K.S., R.C. Sims, R.R. Dupont, Doucette, W.J. and Matthews, J.E. 1990b. Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity, Environmental Toxicology Chemistry, 9: 187-195.
13- Yu, X., X. Wang, R. Bartha and J.D. Rosen. 1990. Supercritical fluid extraction of coal tar contaminated soil, Environmental Science Technology, 24: 1732-1738.