تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن بر تجزیه زیستی آن توسط جدایه شور دوست Q-SH1

ملک حسین شهریاری
استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن بر تجزیه زیستی آن توسط جدایه باکتری شوردوست در شرایط شور انجام گردید. در این تحقیق تعداد دوازده جدایه باکتریایی دارای توانایی تجزیه فنانترن از خاک‌های شور و سدیمی آلوده به پسماندهای نفت خام منطقه سراجه قم جداسازی گردید. جدایه شوردوست Q-SH1 که در بین جدایه‌ها از لحاظ تجزیه فنانترن توانایی بیشتری داشت به عنوان جدایه برتر انتخاب گردید. تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن (۴۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و۲۰۰۰ mg/L) بر تجزیه‌زیستی فنانترن توسط جدایه شوردوست Q-SH1 در زمان های ۱، ۲، ۳، ۶ و ۱۰ روز بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تجزیه فنانترن توسط جدایه شوردوست Q-SH1 در غلظت ۴۰ mg/L فنانترن به میزان ۸۳ درصد بود و با افزایش غلظت فنانترن در محیط، درصد تجزیه آن کاهش یافت. همچنین بیشترین سرعت تجزیه فنانترن نیز ۳۲/۷ mg/L.day در تیمار ۵۰۰mg/L بود.

واژه های کلیدی: فنانترن، تجزیه زیستی، باکتری های شور دوست، شوری

مقدمه

تجزیه‌زیستی یکی از فرآیندهایی است که توسط میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده انجام می‌گیرد و طی آن ترکیبات تجزیه-پذیر توسط ریزسازواره‌ها به ترکیبات ساده‌تر تجزیه می‌شوند. به طور کلی در هر راهکار اصلاحی، تشخیص عوامل محدودکننده سرعت بالقوه پالایش ضروری می‌باشد. دو نوع آلاینده مهم و مشترک در خاک‌های مناطق بهره‌برداری نفت و گاز، هیدروکربن-های نفتی و غلظت زیاد املاح (شوری) در خاک این مناطق می‌باشد. خاک‌های آلوده به این آلاینده‌ها معضل اساسی است، که صنایع نفت و گاز با آن مواجه هستند و می‌تواند منشاء اثرات منفی جبران‌ناپذیری بر محیط زیست، سلامت انسان‌ها و اقتصاد جوامع باشد. اصلاح خاک‌های شور آلوده به هیدروکربن‌های نفتی مشکل عمده‌ای است که ناشی از برهمکنش پیچیده بین آلاینده‌ها و خاک می‌باشد. علاوه بر مکان‌های بهره‌برداری نفت و گاز، شوری به طور کلی در مناطق خشک و نیمه خشک رخ می‌دهد جایی که آبشویی پروفیل خاک به خوبی صورت نمی‌گیرد. خاک‌های متأثر از نمک در حدود ۴۰ درصد از اراضی سطح جهان را به خود اختصاص داده‌اند (Zahran, 1994).

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای نیز از جمله آلاینده‌هایی هستند که در محیط خاکی فراگیر می‌باشند. فنانترن یکی از ترکیبات هیدروکربنی است که در اکثر مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی یافت می‌شود. از آنجا که فنانترن جزء هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و از طرف دیگر توسط میکروارگانیزم های خاک نسبتا تجزیه‌پذیر است، در اکثر مطالعات به عنوان مدل برای بررسی تجزیه‌زیستی مورد استفاده قرار گرفته است. تجزیه میکروبی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای مانند دیگر آلاینده‌های آلی به میزان جذب و متابولیسم هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای به وسیله سلول و میزان انتقال آن‌ها به درون سلول بستگی دارد. همچنین وجود املاح اضافی در خاک می‌تواند بر روی فعالیت و توانایی میکروارگانیزم های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک تأثیرگذار باشد(Cook et al.,2002).

کارایی روش‌های معمول اصلاح خاک مانند زیست‌پالایی[1] که شامل استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها می‌باشد و یا استفاده از گیاهان (گیاه‌پالایی[2]) به طور معنی‌داری در حضور غلظت زیاد نمک‌ها در خاک کاهش می‌یابد (Minai-Tehrani et al., 2009). زیست پالایی موثر در محیط های شوری که به هیدروکربن‌های نفتی آلوده می‌باشند بستگی به توانایی

1. Bioremediation
2. Phytoremediation

میکروفلور طبیعی محیط برای تحمل شوری و آلاینده‌های محیط دارد. شوری به عنوان یکی از فاکتورهای بسیار تأثیرگذار بر تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای توسط محققین متعددی گزارش شده است(Chen et al.,2008; Minai-Tehrani et al., 2009). در حالی‌که در محیط‌های شور، غلظت نمک به عنوان یکی از مهمترین عوامل در تجزیه زیستی آلاینده ها نقش دارد اما توانایی میکروارگانیزم ها در تجزیه و تحمل غلظت بالای آلاینده نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن بر تجزیه زیستی آن توسط جدایه باکتری شوردوست در شرایط شور انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از چهار خاک شور و سدیمی آلوده به نفت خام در منطقه بهره‌برداری نفت و گاز سراجه قم در ایران از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری انجام شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴°C نگهداری شدند. پارامترهای مهم خاک شامل هدایت الکتریکی (EC[3])، pH، درصد رطوبت اشباع، کاتیون‌های غالب خاک شامل سدیم، کلسیم، منیزیم و پتاسیم و آنیون‌های مهم شامل کلرید، سولفات، کربنات و بیکربنات با روش‌های استانداردانداره گیری شد (Sparks, 1996).

جدول۱- نتایج برخی از پارامترهای شیمیایی خاک های شور و سدیمی آلوده به نفت خام

نمونه‌های خاک	Na^{+}	Ca^{+2}	Mg^{+2}	K^{+}	Cl^{-}	HCO_3^{-}	CO_3^{-2}	SO_4^{-2}	EC	pH	SAR	SP
	(meq L^{-1})								(dS m^{-1})			(%)
۱	۱۰۲۱/۷	۵۱۵	۱۲۵	۲/۷۶	۱۷۴۰	۵/۶	۰	۳۸/۳۴	۱۲۳/۲	۷/۸۳	۵۷/۱۱	۳۹/۴
۲	۱۱۹۳/۲	۵۳۰	۱۲۰	۳/۷۳	۱۹۷۴	۵/۴	۰	۴۵/۳۹	۱۳۶/۸	۷/۹۲	۶۶/۱۸	۳۹/۲۲
۳	۳۳۰۹/۸	۸۲۵	۱۴۰	۲۴/۱۲	۴۷۰۰	۱۰	۱/۴	۱۸/۳۹	۲۲۶	۷/۹۵	۱۵۰/۶۷	۲۷/۲۳
۴	۳۱۵۹/۹	۷۸۰	۱۴۵	۲۴/۹۴	۴۴۰۰	۹/۶	۱/۲	۱۶/۵۹	۲۲۲	۷/۹	۱۴۳/۹۳	۲۸/۴۷

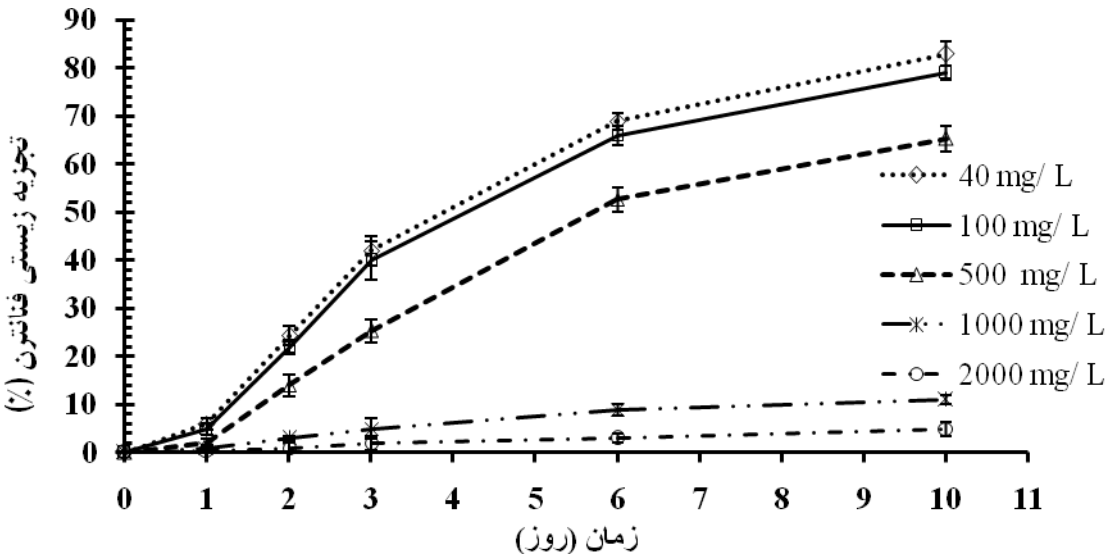
برای غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن ، ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک آلوده به پسماند نفت خام به محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تغییر یافته مک گینتی[4] (۲۰۱۰) دارای ۸۰ mg L^{-1} فنانترن اضافه گردید و در دمای ۳۷°C با دور ۱۵۰rpm شیک گردید. جهت تکمیل فرآیند غنی‌سازی، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت غنی شده به ۹۰ میلی لیتر از محیط کشت نمکی تازه دارای تمام شرایط قبل انتقال داده شد و این عمل ۸ بار تکرار گردید. پس از اتمام آخرین مرحله غنی‌سازی جداسازی و غربالگری باکتری‌های شوردوست دارای توانایی تجزیه فنانترن با استفاده از دو روش اسپری کردن بر روی محیط کشت و کدورت‌سنجی انجام شد (Kumar et al., 2008). سپس ارزیابی تجزیه‌زیستی فنانترن در باکتری-های مقاوم به شوری انجام گرفت.

3. Electrical Conductivity
4 . McGenity

جدایه Q-SH1 جداسازی شده که بیشترین تجزیه فنانترن را نشان داده بودند جهت بررسی‌های بیشتر به عنوان سویه برتر انتخاب گردید. جهت بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن، شوری ۱۰ درصد (شامل نمک‌هایNaCl، Na_2SO_4، KCl، $MgCl_2$ با نسبت ارائه شده در محیط کشت تغییر یافته مک گینتی (۲۰۱۰)) و دمای ۳۷ °C انتخاب و از غلظت‌های ۴۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ mg L^{-1} فنانترن به عنوان منبع کربن در محیط کشت تغییر یافته مک‌گینتی (۲۰۱۰) استفاده شد. غلظت فنانترن باقی‌مانده در محیط کشت در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۶ و ۱۰ روز اندازه‌گیری گردید. اندازه-گیری فنانترن بر طبق روش کلی[5] و همکاران، (۱۹۹۱) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر انجام گردید. به منظور تایید نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر، در برخی از نمونه‌ها، مجددا غلظت فنانترن با دستگاه HPLC[6] مدل Agilent 1100 اندازه گیری شد. آزمایش‌ها در سه تکرار همراه با یک نمونه شاهد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که جدایه Q-SH1 توانست در شوری ۱۰ درصد در طی مدت ۱۰ روز، فنانترن را در غلظت‌های مختلف ۴۰، ۱۰۰ و ۵۰۰mg L^{-1} به صورت چشمگیری کاهش دهد. حدود ۸۳ درصد فنانترن در غلظت ۴۰ mg L^{-1}، در مدت ۱۰ روز توسط جدایه Q-SH1 تجزیه شد (شکل ۱). در پایان ۱۰ روز، در غلظت اولیه ۵۰۰mg L^{-1} فنانترن تجزیه‌زیستی آن توسط جدایه Q-SH1 به ۶۵ درصد رسید. اما با افزایش غلظت فنانترن درصد تجزیه آن توسط همین جدایه به شدت کاهش یافت. به طوری که در ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰mg L^{-1}، درصد تجزیه فنانترن در پایان ۱۰ روز، به ترتیب حدود ۱۱ و ۵ درصد مشاهده شد.



شکل ۱- تجزیه زیستی فنانترن در غلظت‌های مختلف آن توسط جدایه Q-SH1 در غلظت ۱۰ درصد نمک در دمای ۳۷°C. خطوط خطا بیانگر خطای استاندارد در سه تکرار آزمایش می‌باشد.

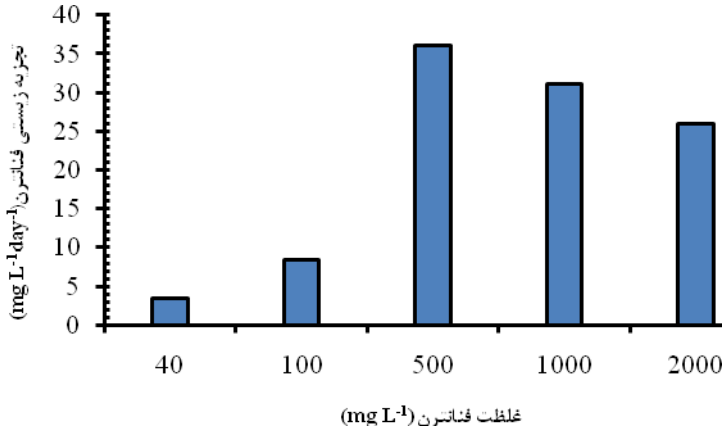
سایر محققین نیز گزارش کرده‌اند که با افزایش غلظت فنانترن درصد تجزیه آن کاهش می‌یابد. آرولاژگان و واسودوان[7] (۲۰۰۹)، گزارش کردند که با افزایش غلظت فنانترن از ۲۰ به ۵۰ و ۱۰۰ mg L^{-1}، تجزیه فنانترن به ترتیب ۶ و ۲۱ درصد نسبت به غلظت ۲۰ mg L^{-1} در مدت چهار روز دوره آزمایش توسط مجموعه میکروبی در شوری سه درصد کاهش یافت.

5. Kelley
6 . High-Performance Liquid Chromatography
7 . Arulazhagan and Vasudevan

المعلم[8] و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش کردند که چهار جدایه آرکئا شوردوست پس از ۳ هفته از شروع آزمایش، تنها توانایی تجزیه ۱۳ تا ۳۰ درصد فنانترن بسته به نوع و شرایط را داشتند.

سویه *Burkholderia cocovenenans* (BU-3) در مدت ۱۶ روز، بیش از ۹۵ درصد فنانترن را در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ mg L^{-1} کاهش داد و با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ mg L^{-1} ، تنها ۶۵ درصد فنانترن تجزیه گردید (Wang et al., 1999). محققین گزارش کردند که سویه H-28 از *Halomonas eurihalin*a قادر است ۵۰ درصد فنانترن را در غلظت ۵۱/۳ g L^{-1} کلرید سدیم تجزیه نماید (Martínez-Checa et al., 2002).

بررسی سرعت تجزیه‌زیستی فنانترن نشان داد که سرعت تجزیه فنانترن در مدت ۱۰ روز در غلظت‌های ۴۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ mg L^{-1} به ترتیب ۳/۳، ۷/۹ ، ۳۲/۷، ۱۱ و ۱۰ mg $L^{-1}day^{-1}$ می‌باشد (شکل۲).



شکل ۲- سرعت تجزیه زیستی فنانترن در غلظت‌های مختلف توسط جدایه Q-SH1 در غلظت ۱۰ درصد نمک در دمای ۳۷°C در مدت زمان ۱۰ روز

با افزایش غلظت فنانترن از ۴۰ به ۵۰۰ mg L^{-1}، سرعت تجزیه فنانترن روند افزایشی را نشان داد که می‌تواند به دلیل استفاده باکتری از فنانترن به عنوان منبع کربن باشد، اما با افزایش غلظت فنانترن به ۱۰۰۰ mg L^{-1}، سرعت تجزیه فنانترن نسبت به غلظت‌های کمتر کاهش یافت، که احتمالا به دلیل سمیت ناشی از غلظت‌های زیاد فنانترن برای این جدایه می‌باشد. محققین دیگر نیز تجزیه فنانترن با سرعت ۲/۹ تا ۳/۳ mg L^{-1} h^{-1} توسط *Mycobacterium* sp. گزارش کردند (Tiehm, 1994). بیشترین سرعت تجزیه فنانترن در غلظت ۵۰۰ mg L^{-1} در طی ۶ روز بوده است (۴۳/۹ mg $L^{-1}day^{-1}$). بیشترین سرعت تجزیه فنانترن را ۴/۲ mg h^{-1} در طی ۲ تا ۴ روز از شروع آزمایش گزارش دادند (Wang et al., 1999).

منابع:

Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H., M. Eliyas M., Radwan S.S. 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Persian Gulf. Extremophiles. 14: 321–328.

Arulazhagan P. and Vasudevan N. 2009. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. 58: 256–262.

Chen J., Wong M.H., Wong Y.S., Tam N.F.Y. 2008. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. A bacterial strain isolated from mangrove sediment. Marine pollution bulletin. 57: 695–702.

Cook S.V., Chu A. and Goodman R.H. 2002. Leachability and toxicity of hydrocarbons, metals and salt contamination from flare pit soil. Water, Air, and Soil Pollution. 133: 297-314.

8. Al-Mailem

Kelley I. and Cerniglia C.E. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of mycobacterium. Journal of Industrial microbiology.7:19-26.

Kumar M., León V., Materano A.D.S., Ilzins O.A. and Luis L. 2008. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. World Journal of Microbioogy and Biotechnology. 24: 1047–1057.

Martínez-Checa F., Toledo F.L., Vilchez R., Quesada E. and Calvo C. 2002. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology. 58: 358–363.

McGenity T.J. 2010. Halophilic hydrocarbon degraders. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin.4-123.

Minai-Tehrani D., Minoui S. and Herfatmanesh A. 2009. Effect of Salinity on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) of Heavy Crude Oil in Soil. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 82: 179–184.

Sparks D.L. 1998. Methods of Soil Analysis Part 3.Chemical Methods. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Tiehm A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, Applied Environment Microbiology. 60, 258-263.

Wang Z., Fingas M., Shu Y.Y., Sigouin L., Landriault M., Lambert P., Turpin R., Campagna P. and Mullin J. 1999. Quantitative characterization of PAHs in burn residue and soot samples and differentiation of pyrogenic PAH1 from petrogenic PAHs - The 1994 mobile burn study. Environmental Science and Technology. 33: 3100-3109.

Zahran H.H. 1994. Diversity, adaption and activity of the bacterial flora in saline environments. Biol. Fert Serrano R., Gaxiola R. Microbial model and salt stress tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences.13: 121–138.

halophilic strain The effect of different concentrations of phenanthrene on biodegradation of Q-SH1

Malek Hossein Shahriari
Assistant Professor of Horticulture Department, Persian Gulf University

Abstract

This study was conducted on the effect of different concentrations of phenanthrene on biodegradation of it by halophilic bacteria strain in saline conditions. In this study twelve bacterial strains have the ability to degrade phenanthrene was isolated from saline and sodic soils contaminated with crude oil waste of Sarajeh Qom. Q-SH1 halophilic strain among isolates showed high ability for degrading phenanthrene and was selected as superior strain. The effect of different concentrations of phenanthrene (40, 100, 500, 1000 and 2000 mg/L) were investigated on phenanthrene biodegradation by Q-SH1 halophilic strain in different times including 1, 2, 3, 6 and 10 days. The results showed that the highest amount of phenanthrene biodegradation by Q-SH1 halophilic strain was observed in 40 mg/L phenanthrene treatment at a rate of 83%. The percent of phenanthrene biodegradation was decreased with increasing the concentration of phenanthrene. As well as the highest rate of biodegradation of phenanthrene was 32.7 mg / L.day in 500 mg/L treatment.

Keywords: Phenanthrene, Biodegradation, Halophilic Bacteria, Salinity