بررسی رشد کنسرسیوم باکتری‌های شوردوست و تجزیه‌زیستی فنانترن در دماهای مختلف

ملک حسین شهریاری[1]
۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر دما بر رشد کنسرسیوم باکتری‌های شوردوست تجزیه کننده فنانترن و تجزیه‌زیستی آن انجام گردید. کنسرسیوم باکتریایی تجزیه کننده فنانترن از خاک شور و سدیمی آلوده به پسماند نفت خام سراجه قم جداسازی گردید. تاثیر دماهای مختلف (۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۵۴ °C) در مدت زمان ۱۰ روز، بر رشد کنسرسیوم باکتریایی و توانایی تجزیه فنانترن توسط این کنسرسیوم بررسی گردید. نتایج نشان داد که کنسرسیوم باکتریایی شوردوست توانایی رشد در طیف وسیعی از دمای ۱۵ تا ۵۴ °C را دارد اما بیشترین رشد در دمای ۳۷ °C بود. این کنسرسیوم همچنین توانایی مناسبی جهت تجزیه فنانترن در رنج دمایی ۲۰ تا ۴۵ °C داشت و بیشترین درصد تجزیه فنانترن در دمای ۳۷ °C، به میزان ۸۷ درصد در پایان ۱۰ روز صورت گرفت که با بیشترین رشد باکتریایی همخوانی داشت.

واژه‌های کلیدی: شوری، دما، فنانترن، تجزیه زیستی، کنسرسیوم باکتریایی

مقدمه

در مناطق گرم و خشک، کمبود رطوبت خاک، شوری خاک و دمای بالا فاکتورهای عمده تنش‌زا برای جمعیت میکروبی خاک هستند، و معمولاً به طور همزمان رخ می‌دهند. تنش شوری یکی از مهمترین فاکتور غیرزیستی است که رشد گیاهان و فعالیت ریزسازواره‌های خاک را در مناطق خشک و نیمه خشک تحت تاثیر قرار می‌دهد. ساردینها[1] و همکاران (۲۰۰۳)، گزارش کردند که شوری با محدود نمودن زیست‌فراهمی آب و تاثیر بر روی فیزیولوژی سلولی و فرآیندهای متابولیکی به طور زیان‌آوری بر روی فرآیندهای میکروبیولوژیکی موثر می‌باشد. نتایج متناقضی از تاثیر شوری بر فعالیت و زیست توده میکروبی در منابع مختلف گزارش شده است. به نظر می‌رسد، چنین اختلافاتی ناشی از شرایط شوری خاک‌ها (شوری طبیعی یا مصنوعی)، کمیت یا کیفیت (ترکیب و نوع) نمک‌های محلول، وجود یا عدم وجود گیاه و فعالیت‌های کشاورزی باشد.

در خاک‌های شور و تحت تنش خشکی، میکروب‌ها از تنش اسمزی زیان می‌بینند که ناشی از خشک شدن و تحلیل رفتن سلول‌هاست. با این وجود ریزسازواره‌های خاک توانایی سازگاری و تحمل نمودن تنش اسمزی ناشی از خشکی و شوری را دارا هستند، به ویژه زمانی‌که مرتباً در معرض چنین شرایطی باشند (Sparling et al., 1989).

شوری بالا محیطی با شرایط سخت ایجاد می‌کند که تنها تعداد محدودی از موجودات قادر به ادامه رشد در آن شرایط و قابلیت انطباق با آن را دارا هستند. شوردوست‌ها موجوداتی هستند که در محیط با غلظت زیاد نمک رشد می‌کنند. مثال‌هایی از رشد مناسب میکروب‌ها در محیط با شوری زیاد وجود دارد که بیانگر پتانسیل تکاملی ریزسازواره‌ها می‌باشد. بنابراین ریزسازواره‌ها باید با افزایش فشار اسمزی مقابله کنند و در نتیجه ممکن است در ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک آن‌ها در پاسخ به این شرایط تغییراتی ایجاد شود. این سازگاری در نهایت منجر به ایجاد جامعه میکروبی فعال‌تر از لحاظ فیزیولوژیکی می‌شود که در نتیجه کارایی بالاتری در مصرف سوبسترا به دنبال دارد (Zahran, 1994).

برای رهایی از غلظت زیاد نمک، شوردوست‌ها دو مکانیسم مختلف جهت جلوگیری از دست دادن آب از طریق انتقال اسمزی آب به خارج از سلول‌هایشان اعمال می‌کنند. هر دو مکانیسم بر اساس اسمولاریته سلول می‌باشد. آن‌ها باید قادر باشد غلظت نمک‌ها را در سیتوپلاسم با محیط اطراف تنظیم نماید. دو استراتژی اساسی برای سازگاری ریزسازواره‌ها با تنش‌های

1. Sardinha

اسمزی مانند شوری بیان شده است ۱- ممانعت انتخابی جذب نمک‌های آمیخته به هم مانند Na^+ و Cl^- و بنابراین تجمع یون‌های ضروری دیگر مانند K^+ وNH_4^+ برای جایگزینی متابولیسم می‌باشد که منجر به حفظ غلظت نمک در درون سلول به صورتی‌که حداقل معادل غلظت نمک در محیط بیرون از سلول گردد و ۲- سازگاری سلول از طریق تولید و تجمع نمک‌های آلی سازگار می‌باشد که شیب غلظت بین محلول خاک و سیتوپلاسم سلولی را برعکس می‌کند. افزایش غلظت نمک در سیتوپلاسم نه تنها محیط درون را با محیط بیرون متعادل می‌کند بلکه به ثبات بیشتر درون سلول منجر می‌شود (Welsh, 2000).

نقش اساسی دما به عنوان عامل بسیار مهم در تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های نفتی اولاً به وسیله تاثیر مستقیم بر شیمی آلاینده و ثانیاً از طریق اثر بر فیزیولوژی و تنوع میکروبی می‌باشد. دمای محیط بر روی ویژگی‌های نفت‌خام و فعالیت یا جمعیت ریزسازواره‌ها تاثیرگذار می‌باشد. در دمای کم، ویسکوزیته نفت افزایش یافته، در حالی‌که تصعید مولکول‌های هیدروکربنی سبک وزن سمیت‌زا، کاهش می‌یابد که می‌تواند شروع تجزیه‌زیستی را به تاخیر اندازد. دما از طرق مختلف بر روی انحلال پذیری هیدروکربن‌ها موثر است. هر چند تجزیه‌زیستی می‌تواند در محدوده وسیع دمایی صورت گیرد، اما به طور کلی با کاهش دما از سرعت تجزیه‌زیستی نیز کاسته می‌شود (Foght et al., 1996).

با توجه به اهمیت تجزیه آلاینده‌های آلی محیط زیست از طریق تجزیه زیستی و همچنین وجود عوامل تنش‌زای محیطی از جمله شوری و دمای بالا در کشور ما این تحقیق به منظور بررسی تاثیر دما بر رشد کنسرسیوم باکتری‌های شوردوست تجزیه کننده فنانترن و تجزیه‌زیستی آن 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. به منظور غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنانترن، ۱۰ گرم از چهار نمونه خاک آلوده به پسماند نفت خام به فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تغییر یافته مک گینتی (۲۰۱۰) حاوی ۸۰mg/L فنانترن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت هفت روز روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. 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، محصول نهایی به ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه حاوی ۱۰ mg/L فنانترن اضافه گردید و گرماگذاری به مدت ۷ روز در شرایط ذکر شده انجام شد. محصول نهایی به عنوان کنسرسیوم باکتریایی، جهت ارزیابی تجزیه زیستی فنانترن استفاده شد. کنسرسیوم جداسازی شده از خاک سه (جدایه‌های غالب آن، Q-SH12، Q-SH3 و Q-SH14 بودند) که آنالیز فنانترن باقیمانده در محیط نشان داد بیشترین تجزیه فنانترن توسط این کنسرسیوم انجام گرفته است به عنوان کنسرسیوم برتر انتخاب شد. برای بررسی تاثیر دما از غلظت بهینه ۱۰ درصد شوری، شامل نمک های NaCl، Na_2SO_4، KCl، $MgCl_2$ با نسبت ارائه شده در محیط کشت تغییر یافته مک گینتی[2] (۲۰۱۰)، و غلظت ۴۰ mg/L فنانترن استفاده شد. میزان تجزیه فنانترن توسط کنسرسیوم انتخاب شده در دماهای مختلف (۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۵۴ °C) به مدت ۱۰ روز، پس از استخراج فنانترن اندازه‌گیری گردید. رشد باکتری‌ها نیز در محیط کشت تغییر یافته مک گینتی (۲۰۱۰) حاوی فنانترن در دماهای مختلف در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

به منظور آماده سازی نمونه‌ها برای آنالیز با دستگاه‌های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با قابلیت بالا (HPLC)، ابتدا محتویات لوله‌های آزمایش با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت استخراج فنانترن، محلول رویی جدا گردید. ۱۰ میلی‌لیتر n- هگزان به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد. در نهایت فاز آلی آبگیری شده با سولفات سدیم بدون آب جهت تعیین غلظت فنانترن باقی‌مانده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه-

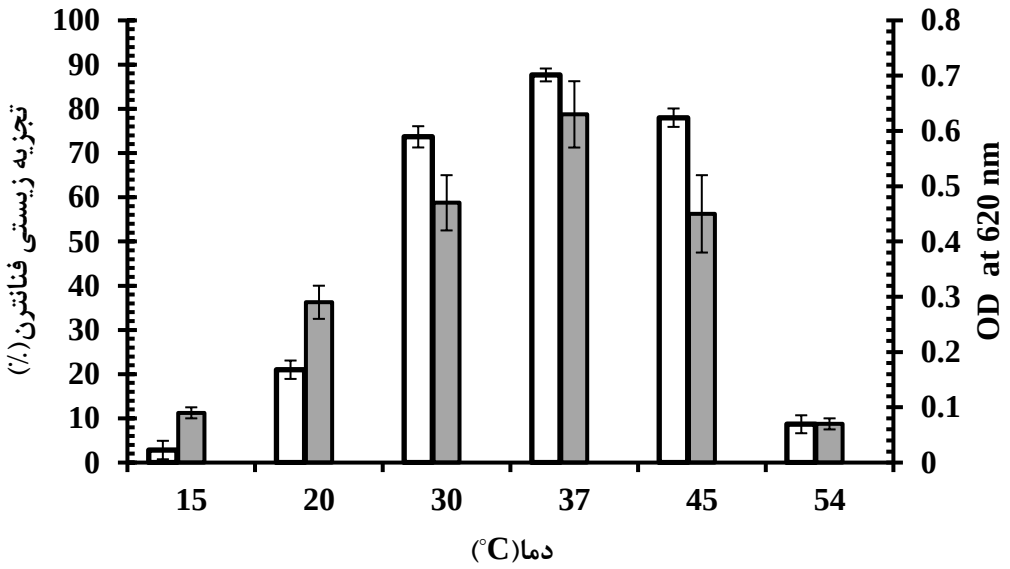
2 . McGenity

گیری گردید (Kelley et al., 1991). به منظور تایید نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر، در برخی از نمونه‌ها، مجددا غلظت فنانترن با دستگاه HPLC[3] مدل Agilent 1100 اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

تاثیر دماهای مختلف بر تجزیه زیستی فنانترن توسط کنسرسیوم باکتری‌های شوردوست در طیف دمایی ۱۵ تا ۵۴ °C نشان داد که بیشترین تجزیه‌زیستی فنانترن در دمای ۳۷ °C بود، و تجزیه‌زیستی در طیف دمایی ۳۰ تا ۴۵ °C قابل‌توجه می‌باشد، به طوری‌که بیش از ۷۰ درصد غلظت اولیه فنانترن در مدت ۱۰ روز توسط کنسرسیوم باکتری‌های شوردوست در این گستره دمایی تجزیه شد (شکل۱). با افزایش دما به ۵۴ °C میزان تجزیه فنانترن شدیداً کاهش یافت. با وجود توانایی کنسرسیوم مخلوط باکتری‌ها به رشد در ۱۵ °C، اما میزان تجزیه فنانترن در این دما جزئی بود.

بیشترین فعالیت کنسرسیوم باکتریایی نیز در ۳۷ °C مشاهده شد، که با میزان تجزیه زیستی هم‌خوانی داشت. با وجود فعالیت بیشتر باکتری‌ها در دمای ۳۰°C نسبت به ۴۵ °C، اما با این حال میزان تجزیه فنانترن در ۴۵ °C بیشتر بود. این ممکن است در نتیجه تاثیر دما در افزایش زیست‌فراهمی فنانترن برای باکتری‌های تجزیه‌کننده باشد که در نهایت می‌تواند منجر به افزایش تجزیه‌زیستی آن‌ها شود.



شکل ۱- درصد تجزیه زیستی فنانترن توسط کنسرسیوم باکتریایی شوردوست در دماهای مختلف (ستون سفید) و همزمان با سنجش رشد باکتری‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر (ستون تیره) در محیط کشت حاوی $40\ mg\ L^{-1}$ فنانترن. خطوط خطا بیانگر خطای استاندارد در سه تکرار آزمایش می‌باشد.

دما و شوری زیاد می‌تواند به عنوان عواملی محدودکننده جهت تجزیه‌زیستی ترکیبات آلی مطرح باشد. ساتیش کومار[4] و همکاران (۲۰۰۸)، توانایی چهار سویه و مخلوطی از کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده نفت خام در محدوده دمایی ۲۵ تا ۴۵ °C بررسی کردند و بیشترین تجزیه در دماهای ۳۵ تا ۴۵ °C گزارش نمودند. اگرچه این نتایج نسبت به بسیاری از نتایج ارائه شده، تجزیه فنانترن را در دامنه دمایی وسیع‌تری نشان می‌دهد اما ژائو[5] و همکاران (۲۰۰۸)، نیز نشان دادند که کنسرسیوم باکتریایی شوردوست توانایی تجزیه فنانترن در گستره دمایی ۴ تا ۵۵ °C را دارد، هر چند در مطالعات آن‌ها نیز تجزیه در

3 . High-Performance Liquid Chromatography
4 . Sathishkumar
5 . Zhao

دماهای ۴ و ۵۵°C بسیار ناچیز گزارش گردید. نقش اساسی دما به عنوان عامل بسیار مهم در تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های نفتی اولاً به وسیله تاثیر مستقیم بر شیمی آلاینده و ثانیاً از طریق اثر بر فیزیولوژی و تنوع میکروبی می‌باشد. دمای محیط بر روی ویژگی‌های نفت‌خام و فعالیت یا جمعیت ریزسازواره‌ها تاثیرگذار می‌باشد. در دمای کم، ویسکوزیته نفت افزایش یافته، در حالی‌که تصعید مولکول‌های هیدروکربنی سبک وزن سمیت‌زا، کاهش می‌یابد، که می‌تواند شروع تجزیه‌زیستی را به تاخیر اندازد . دما از طرق مختلف بر روی انحلال‌پذیری هیدروکربن‌ها موثر است. هر چند تجزیه‌زیستی می‌تواند در محدوده وسیع دمایی صورت گیرد، اما به طور کلی با کاهش دما از سرعت تجزیه‌زیستی نیز کاسته می‌شود (Foght et al., 1996).

توانایی تجزیه‌زیستی فنانترن در طیف دمایی وسیع با توجه به نوسانات فصلی دمای محیط زیست و تفاوت دمایی بین خاک سطحی و خاک زیرین حائز اهمیت می‌باشد. تجزیه فنانترن در دماهای نسبتا زیاد (۳۰ تا ۴۵ °C) از دوجنبه حائز اهمیت می‌باشد، از یک طرف در اکثر مناطق نفت‌خیز ایران و عمده کشورهای بزرگ تولیدکننده نفت خام در طی تابستان، دما زیاد می‌باشد، از طرف دیگر با افزایش دما انحلال‌پذیری هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در آب زیاد می‌شود و در نتیجه زیست‌فراهمی‌آن‌ها برای میکروب‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌ها افزایش می‌یابد و در نهایت می‌تواند منجر به افزایش سرعت تجزیه‌زیستی آن‌ها گردد (Van Hamme et al., 2003).

منابع

Foght J.M, Westlake D, Johnson W.M. and Ridgway H.F. 1996. Environmental gasoline-utilising isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. Microbiology, 142: 1333-2340.

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

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

Sardinha M., Müller T., Schmeisky H. and Joergensen R.G. 2003. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. Applied Soil Ecology, 23: 237-244.

Sathishkumar M., Binupriya A.R., Baik S.H., and Yun S.E. 2008. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. Clean, 36(1): 92–96

Sparling G.P. 1997. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. Biological Indicators of Soil Health, 97-119.

Van Hamme J.D., Singh A. and Ward O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev, 67:503–549.

Welsh D.T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. FEMS Microbiology Review, 24: 263-290.

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.

Zhao B., Wang H., Mao X. and Li R. 2009. Biodegradation of phenanthrene by a halophilic bacterial consortium under aerobic conditions. Current Microbiology, 58(3): 205-210.

The phenanthrene biodegradation and growth of halophilic bacterial consortium at different temperatures

M. H. Shahriari[1]
1- Assistant Professor of Horticulture Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University

Abstract
The purpose of this study was to investigate the growth and phenanthrene-degrading abilities of the halophilic bacteria consortium in different temperature. The bacterial consortium was isolated from saline and sodic soils contaminated with waste crude oil of Sarajeh Qom. The effect of different temperatures (15, 20, 30, 37, 45 and 54 °C) was investigated on the bacterial consortium growth and boidegradation of phenanthrene by this consortium in 10 days of experiment. The results showed that the bacterial consortium had the ability to grow on a wide range of temperature 15 to 54°C, but the optimal growth was observed at 37°C. This halophilic bacterial consortium was able to break down phenanthrene in the temperature range of 20 to 45°C, and the highest phenanthrene degradation (87%) was obtained at temperature of 37°C at the end of 10 days of experiment, which is consistent with bacterial growth.

Keywords: Salinity, Temperature, Phenanthrene, Biodegradation, Bacterial consortium