انتقال باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس (*Rhodococcus erythropolis*) در ستون‌های شن تحت جریان پیوسته غیراشباع-اشباع

نصراله سپهرنیا [۱]، محمدعلی حاج‌عباسی [۲]، مجید افیونی [۲] و محمدرضا مصدقی [۳]
۱-دانشجو دکترا گروه خاک‌شناسی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲- استاد دکترا گروه خاک‌شناسی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳- دانشیار گروه خاک‌شناسی دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده
شناخت انتقال باکتری‌ها اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های زیست‌پالایی محیط‌های زیرسطحی دارد. در این پژوهش اثر تزریق باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس در دو زمان متفاوت با برقراری جریان اشباع و غیراشباع به شکل پیوسته در ستون‌های شن، بررسی شد. تزریق باکتری‌ها با غلظت (CFU ml-۱) ۳/۱ ×۱۰۸ در ۱ و ۲ پالس انجام شد. در تزریق ۲ پالسی، پالس اول در زمان خشک‌بودن ستون‌ها اعمال شده و با برقراری جریان اشباع ماندگار پالس دوم تزریق شد. در ستون‌های ۱ پالسی، تنها در ابتدای آزمایش تزریق انجام شد. غلظت باکتری‌ها با استفاده منحنی واسنجی غلظت-جذب برآورد باکتری شد. نتایج نشان داد شرایط اولیه تزریق باکتری بر انتقال باکتری‌ها موثر بوده و در دو جریان اشباع و غیراشباع در زمان‌های ابتدایی بیش‌ترین باکتری در زه‌آب دیده شد. وضعیت رطوبتی اولیه و آب‌گریزی باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس به عنوان دو عامل مهم در جذب باکتری‌ها در اثر تغییر جریان از غیراشباع به اشباع می‌تواند موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی آب، انتقال باکتری، جریان اشباع، جریان غیراشباع، آب‌گریزی

مقدمه
فهم و شناخت انتقال باکتری‌ها در خاک از اهمیت ویژه‌ای در موفقیت برنامه‌های زیست‌پالایی محیط‌های زیرسطحی دارد. یکی از مهم‌ترین مسائل در موفقیت این پروژه‌ها، رسیدن باکتری‌های مورد نظر به ناحیه آلوده است. در بسیاری از پژوهش‌های انتقال باکتری، به منظور تخریب زیستی آلاینده‌ها، جذب باکتری‌ها روی سطوح کانی‌ها پخشیدگی موثر باکتری‌ها در خاک را به طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد. جذب باکتری‌ها روی سطوح کانی‌ها تاثیرپذیر از عوامل بیولوژیکی مرتبط با سلول باکتری‌ها و عوامل فیزیکی و شیمیایی مرتبط با محیط متخلخل است. بر اساس نظریه پالایش، اثرات عوامل فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک به دو حالت امکان‌پذیر است: ۱- احتمال برخورد باکتریایی به یک ذره رسوب به هنگام نزدیک‌شدن (راندمان جمع‌کننده) و ۲- احتمال جذب باکتریایی به محیط جمع‌کننده به هنگام برخورد (راندمان برخورد). راندمان جمع‌کننده برای عوامل فیزیکی در نظر گرفته می‌شود که تناوب برخورد باکتری‌ها نسبت به شار باکتری‌ها به سمت جمع‌کننده را کنترل می‌کنند و برای عوامل شیمیایی و بیولوژیک، راندمان برخورد محاسبه می‌شود که با استفاده از نظریه DLVO توصیف می‌شود. به طور خلاصه، این نظریه نیروی اثرات متقابل کل بین باکتری و سطوح ذرات معدنی را در یک فاصله معین تعیین می‌کند. در شرایطی که نیروی اثرات متقابل کل باکتری‌های ترزیق‌شده مثبت باشد احتمال جذب باکتری‌ها بیش‌تر از زمانی است که این نیرو منفی است (Dong et al., ۲۰۰۲).

باکتری‌ها در خاك در بیش‌تر pHها دارای بار خالص منفی هستند. از طرفی بیش‌تر ذرات خاك نیز بار منفی دارند. در نگاه اول به نظر می‌رسد که باکتری و ذرات خاك اثر دافعه بر هم داشته باشند. اما برای خنثی‌کردن بار سطحی سلول باکتری‌ها، یون‌های با بار مخالف کم کم به سطح سلول نزدیك می‌شوند و یك لایه دوگانه پخشیده را تشکیل می‌دهند. اگر سلول با بار منفی در تماس با سطوح با بار مثبت قرار گیرد، جذب می‌شوند تا حدی که غلظت آنها در محلول به صفر نزدیك گردد. اما اگر غلظت در فاز محلول افزایش یابد، جذب سلول کاهش می‌یابد. زیرا رقابت بین گروه‌های آنیونی در سطح سلول باکتری‌ها و آنیون‌های موجود در فاز محلول برای جذب افزایش می‌یابد. از طرفی، با نزدیک‌شدن دو بار منفی به یکدیگر احتمال دفع آنها وجود دارد. دفع این دو بار به برهم‌کنش‌های بین سطح سلول باکتری و سطوح موجود در خاك بستگی دارد، که وضعیت بار الکتریکی سطوح در تماس و برهم‌کنش آب‌گریزی بین سطوح و فاز محلول در این حالت تاثیرگذار است (Unc, ۲۰۰۲).

پژوهش‌های مختلف نشان داده است چهار ویژگی اصلی بیولوژیک که بر جذب باکتری‌ها روی سطح ذرات تاثیرگذار است، شامل بار سطحی باکتری‌ها، آب‌گریزی، اندازه و تحرک سلول می‌باشند. بار سطحی سلول باکتری‌ها، وابسته به pH بوده و با تغییر pH محیط، تغییر می‌کند. بر روی سطح سلول باکتری‌ها گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز وجود دارند که می‌توانند بر جذب و یا دفع باکتری اثر گذاشته و بر فرآیند انتقال آن در خاک مؤثر باشند. باکتری‌ها با خاصیت آب‌گریزی قوی می‌توانند به آسانی جذب سطوح جامد شوند، اما گونه‌های آب‌دوست دارای پوششی از مولکول‌های آب در پیرامون خود هستند که به هنگام نزدیک‌شدن به لایه دوگانه پخشیده سطح ذرات خاک، در لایه‌های بیرونی به طور ضعیفی جذب می‌شوند. به همین دلیل این گونه‌ها به آسانی از سطح ذرات

جدا شده و وارد محلول خاک مي‌شوند. گونه‌های آب‌گریز به هنگام جذب، در عمق لایه دوگانه پخشیده قرار گرفته و در بسیاری موارد جذب اختصاصی و برگشت‌ناپذیر صورت مي‌گیرد. در نتیجه باکتري‌های آب‌دوست نسبت بـه باکتري‌هـای آب‌گریـز تحـرک بیش‌تـری دارند (Dong et al., ۲۰۰۲).

پژوهش‌های انتقال و سرنوشت باکتری با توجه به اهداف مورد نظر در شرایط جریـان (اشـباع و غیراشـباع) و مقیاس‌هـای گونـاگون (ستون‌های آزمایشگاهی، کرت‌های مزرعه‌ای و حوضه) انجام مي‌شود. این پژوهش به بررسی اثر چگونگی تغییر پیوسته جریان آب از وضعیت غیراشباع اعمال‌شده بر حالت خشك (مکـش ۱۵۰۰۰ سـانتي‌متر) تـا رسـیدن بـه جریـان اشـباع مانـدگار بـر انتقـال باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس (Rhodococcus erythropolis) در ستون‌های شن پرداخته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی سـتون‌های (از جنـس PVC، قـطر داخلـی ۳/۸ و ارتـفاع ۲/۱۸ سـانتي‌مـتر) پـر از شـن انجـام شـد. پیـش از نـمونه‌برداری، دیواره درونی استوانه به پارافین آغشته شد تا از ایجاد جریان ترجیحی در محل تـماس شن با سیلندر جلـوگیری شـود. برخی ویژگي‌های فیزیکی توده شن و ستون‌های آماده‌شده مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

گونه‌ی باکتری مورد استفاده در این پژوهش رودوکوکوس اریتروپولیس بود. برای تهیه سوسپانسیون باکتری ابتدا باکتری‌ها بر روی محیط کشت نیوترنت آگار کشت داده شـدند. پـس از ۴۸ سـاعت باکتری‌هـای رشـدکرده بـا ۱۰ میلي‌لیـتر آب مقطـر شستشـو داده شدند. با استفاده از سری رقت ۱۶ غلظت در سه تکرار از باکتری مورد نظر آماده شد. سپس با اسـتفاده از دسـتگاه Spectrophotometer میزان جذب سري‌های غلظت آماده‌شده در طول‌موج ۵۰۳ نانومتر تعیین شد. با شمارش باکتری‌های رشدکرده رابطـه خطـی بیـن ($y=۴/۱\times۱۰^{۸}\times x$ ، ۹۹/۰ = r) برای باکتری حاصل شد. در این معادله x و y به ترتیب میزان جذب و غلظت باکتری است. معادله فوق در Excel Solver بهینه شد. با استفاده از این رابطه، غلظت (CFU ml-۱) ۳/۱ ×۱۰۸ با محلول زمینه برومید پتاسیم (KBr) با قدرت یـونی ۱۰ میلي‌مولار و به عنوان غلظت ورودی برای هر پالس انتخاب شد. pH و شوری سوسپانسیون‌های ورودی نیز تعیین شد.

تزریق سوسپانسیون باکتری‌ها و آب به ستون‌های شن به صورت پالسی انجام شد. بـه ایـن صـورت کـه در ابتـدا کـه سـتـون شـن خـشـک بود، یـک پالـس بـاکتـری با غلظت ۳/۱×۱۰۸ CFU ml-۱ به سطح ستون شن افزوده شد. سپس با استفاده از نفوذسنج مکشی جریان اشباع (مکش ۰ هکتوپاسکال) به ستون‌های شن اعمال شـد. بـا رسـیدن جبهـه رطوبـتی و مشـاهده اولیـن زه‌آب خروجـی بـه انتهای ستون‌ها، نمونه‌برداری در فواصل زمانی مشخص انجام گرفت. به این ترتیب که در زمان‌های پیش از خـروج ۱ برابـر حجـم آب منفـذی (PV)، به فواصل PV۱/۰، و پس از آن به فواصل PV۲۵/۰ انجام شد. در پالس اول، آب‌شویی ستون‌ها تا ۴ برابر حجم آب منفـذی (PV) انجام شد. سپس، تزریق پالس دوم باکتری‌ها با غلظتی برابر با پالـس اول انجام شـد و از زه‌آب‌هـای خروجـی در فواصـل زمـانی برابر پالس اول، نمونه‌برداری شد. در مجموع ۴۴ نمونه از زه‌آب هر ستون برداشت شد. سـپس میـزان جـذب نمونه‌هـای زه‌آب تعییـن شده و با استفاده از رابطه واسنجی بدست‌آمده به غلظت باکتری تبدیل شدند. سـتون‌های بـا ۱ پـالس باکتری مشـابه سـتون‌های دو پالسی بود با این تفاوت که تنها در ابتدای آزمایش یک پالس باکتری به ستون تزریق شـد و آب‌شـویی تـا PV۸ برابـر حجـم آب منفـذی ادامه یافت.

غلظت باکتری‌ها در زه‌آب خروجی در حجم‌های آب منفذی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS به منظور بررسی اثر پالس و وضعیت جریان تجزیه و تحلیل، و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۰۵/۰ α) انجام شد. منحني‌های رخنه بـاکتری بـا استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

برخـی ویژگي‌هـای فیزیکـی سـتون‌های شـن مـورد بررسـی در جـدول ۱ آورده شـده اسـت. (۳/۷) pH و شـوری (۱۶/۲ dS m-۱) سوسپانسیون‌های تزریق‌شده برای باکتری‌ها قابل تحمل بود.

جدول ۱- ویژگي‌های فیزیکی ستون‌های شن مورد مطالعه

K_s (cm min^{-1})	θ_v (cm^3 cm^{-3})	θ_s (g cm^{-3})	θ_b (g cm^{-3})	V_t (cm^3)	PV (cm^3)
۸/۳	۳۴/۰	۶۵/۲	۵۳/۱	۹۸۴	۳۳۱

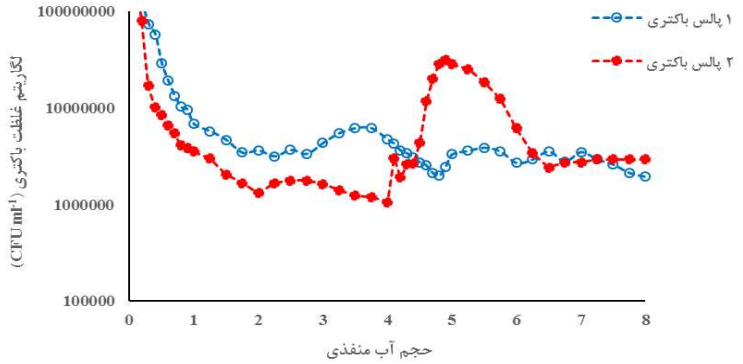
PV: حجم آب منفذی، V_t : حجم ستون، θ_b و θ_s : به ترتیب چگالی ظاهری و حقیقی، θ_v : رطوبت اشباع حجمی، K_s: هدایت هیدرولیکی اشباع.

میانگین منحني‌های رخنه حاصل از تزریق ۱ و ۲ پالس باکتری در شکل ۱ آورده شده است. شکل منحني‌ها پیش از تزریـق پـالس دوم شبیه یکدیگر بودند. با تـوجه بـه یکسـان‌بودن غلظت‌هـای ورودی و همگن‌بـودن سـتون‌های شـن انتظـار مي‌رفـت ایـن بخـش از منحني‌ها بسیار بهم نزدیک باشد. تفاوت ظاهری ایـن دو منحنـی ممکـن اسـت در نـتیجه تفـاوت در آرایـش تصـادفی منافـذ شـن در آزمایش‌های آب‌شویی باشد. با این وجود مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد تفـاوت معني‌داری در ایـن بخـش بیـن منحني‌هـای رخنه وجود ندارد.

با مشاهده بیش‌ترین غلظت باکتری‌ها در PV۱/۰ به نظر مي‌رسد با وجود خشک‌بودن ستون‌های شن در ابتدای آزمایش، میـانگین سرعت انتقال آنها برابر سرعت آب منفذی در ستون‌های شن بوده و فرایند جریان توده‌ای غالب بوده اسـت. بـا گذشـت زمـان غلظـت

باکتری‌ها سریعاً شروع به کاهش کرد. در واقع این چنین کاهش سریع، می‌تواند به دلیل عدم وجود مکان‌های زیاد جذب و هم‌چنین سرعت زیاد آب منفذی (جدول ۱) در ستون‌های شن باشد. نکته جالب توجه در مورد بخش اول منحنی‌های رخنه (شکل ۱) افزایش غلظت باکتری‌ها در فاصله PV۲ تا PV۴ است. به احتمال زیاد، در ابتدای آزمایش که ستون‌های شن کاملاً خشک بوده‌اند بخشی از جمعیت باکتری‌ها به طور موقت جذب ذرات شده‌اند (اتصال فیزیکی) و در ادامه با مرطوب‌شدن پیکره ستون شن دوباره به فاز محلول بازگشته‌اند. در تزریق ۱ پالسی دنباله‌دارشدن منحنی رخنه قابل توجه است (شکل ۱). این نتیجه نشان می‌دهد باکتری‌های جذب‌شده در پیکره ستون‌ها می‌توانند به عنوان منبع ثانویه باکتری برای تزریق دوباره باشند و با ادامه جریان آب به شکل پیوسته رها شوند و با جریان آب حمل و به محیط‌های زیرسطحی برسند. قابل ذکر است که در زمان‌های طولانی تکثیر و مرگ و میر باکتری‌ها ممکن است سبب افزایش و یا کاهش ورود مجدد باکتری‌ها شود.

باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس یک باکتری آب‌گریز است. این باکتری تمایل به جذب‌شدن به سطوح جامد و جداشدن از فاز محلول را دارد. به نظر می‌رسد چنین رفتاری در مورد این باکتری در تزریق ۱ و ۲ پالس باکتری با وجود سرعت زیاد آب منفذی به سه دلیل دیده شد: ۱- صرف‌نظر از پالایش فیزیکی (گیرافتادن باکتری‌ها، تجمع باکتری‌ها و انسداد منافذ)، در زمان مشاهده بیش‌ترین غلظت باکتری‌ها (PV۱/۰ و PV۹/۴) تنها ۵%-۳ درصد باکتری‌های تزریق‌شده در زه‌آب دیده شدند، ۲- در تزریق پالس دوم باکتری با وجود برقراری جریان اشباع ماندگار و جریان آب با بیش‌ترین سرعت در ستون‌ها، در یک فاصله زمانی کوتاه، غلظت باکتری‌های خروجی به غلظت باکتری‌ها با ۱ پالس تزریق می‌رسند و ۳- با فاصله گرفتن از زمان تزریق، در تزریق ۱ پالسی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌ها (که به شکل تصادفی انتخاب شده‌اند) دیده نمی‌شود (جدول ۳).



شکل ۱- منحنی رخنه باکتری *رودوکوکوس اریتروپلیس* با تزریق ۱ و ۲ پالس به ستون‌های شن

با تزریق پالس دوم باکتری همانند تزریق پالس اول، بیش‌ترین غلظت باکتری‌های خروجی در فاصله زمانی کوتاهی در زه‌آب خروجی دیده شدند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد اثر تزریق پالس بر انتقال باکتری معنی‌دار است. در منحنی با ۲ پالس تزریق، غلظت خروجی در زمانی که جریان ماندگار آب در ستون شن برقرار شده (زمان PV۱/۴) با شیب ملایم‌تری نسبت به ابتدای آزمایش (زمانی که خاک خشک است) کاهش یافته است. در واقع با برقراری جریان اشباع حرکت باکتری‌ها سهولت یافته و سبب توزیع یکنواخت‌تر باکتری‌ها در پیکره شن شده است. نتایج ارائه‌شده در جدول ۴ گفته فوق را تایید می‌کنند.

در شکل ۲ با استفاده از آزمون مقایسه میانگین داده‌های مزدوج، منحنی‌های رخنه به چهار بخش تقسیم و بررسی شدند. به عبارت ساده، این آزمون حجم‌های آب منفذی نظیر در بخش اول (دامنه PV۱/۰ تا PV۴) و دوم (دامنه PV۱/۴ تا PV۸) منحنی‌های رخنه را مقایسه می‌کند.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد برای منحنی‌های رخنه ۱ و ۲ پالسی تفاوت معنی‌داری بین بخش اول منحنی رخنه (PV۴-PV۱/۰) و بخش دوم (PV۸-PV۱/۴) وجود دارد (R۱). همان‌طور که انتظار می‌رفت بخش اول منحنی‌های ۱ و ۲ پالسی (شکل ۱، R۲) تفاوت زیادی با یکدیگر نداشتند. بخش دوم منحنی‌های رخنه (R۳) اثر تزریق پالس دوم باکتری را نشان می‌دهد. این مقایسه نشان داد تزریق باکتری اثر معنی‌داری بر انتقال باکتری‌ها در زمانی که جریان اشباع ماندگار برقرار شده است دارد. با وجود تفاوت وضعیت جریان آب و تزریق پالس دوم باکتری، انتظار می‌رفت که در بخش دوم منحنی ۲ پالسی انتقال باکتری‌ها بیش‌تر باشد، اما نتیجه جالب در این مقایسه، عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین بخش‌های اول و دوم بود (R۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در جریان غیراشباع پتانسیل انتقال هم‌زمان جبهه آلودگی باکتری‌ها با جبهه رطوبتی به ویژه در زمان‌های ابتدایی تزریق وجود دارد. (جداول ۳ و ۴). لازم به ذکر است که این پژوهش روی ستون‌های شن انجام شده است و ممکن است در خاک به دلیل متفاوت‌بودن شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک چگونگی انتقال باکتری‌ها متفاوت از نتایج ارائه‌شده شود.

به طور خلاصه می‌توان نتیجه گرفت اثر شرایط جریان آب با توجه به غلظت باکتری در محیط متفاوت است و بیش‌ترین پتانسیل انتقال باکتری‌ها در زمان‌های ابتدای ورود باکتری‌ها به محیط است. نتایج این پژوهش نشان داد در محیط‌های متخلخل

درشت‌بافت و جریان آب با سرعت زیاد، هم‌چنان امکان جذب باکتری رودوکوکوس اریتروپلیس به سطوح ذرات با توجه به ویژگی آب‌گریزبودن آن وجود دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین غلظت خروجی باکتری در تزریق ۱ پالس باکتری

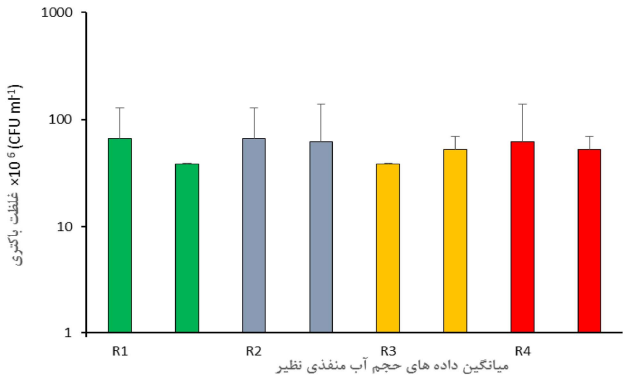
حجم آب منفذی	گروه‌بندی میانگین‌ها ($\times CFU\ ml^{-1}10^{7}$) بر اساس سطح معنی‌داری (۰۵/۰= ۶۸)	
	۱	۲
۸	۶۹/۳	
۹/۴	۷۶/۳	
۶/۴	۷۸/۳	
۶	۷۹/۳	
۷۵/۲	۸۸/۳	
۴	۰۵/۴	
۷۵/۳	۲۳/۴	
۱	۳۱/۴	
۱/۰		۵/۲۹

قرارگرفتن میانگین‌ها در گروه مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار است.

جدول ۴- مقایسه میانگین غلظت خروجی باکتری در تزریق ۲ پالس باکتری

حجم آب منفذی	گروه‌بندی میانگین‌ها ($\times CFU\ ml^{-1}10^{7}$) بر اساس سطح معنی‌داری (۰۵/۰= ۶۸)				
	۱	۲	۳	۴	۵
۴	۶۳/۳				
۷۵/۳	۶۶/۳				
۷۵/۲	۷۵/۳				
۸	۰۳/۴				
۱	۰۵/۴				
۶		۶۵/۴			
۶/۴			۵/۵		
۹/۴				۷۸/۸	
۱/۰					۱/۳۸

قرارگرفتن میانگین‌ها در گروه مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۲- مقایسه میانگین داده‌های مزدوج: R۳، R۲، R۱ و R۴ به ترتیب مقایسه میانگین‌های بخش اول و دوم منحنی ۱ پالسی، بخش اول منحني‌های ۱ و ۲ پالسی، بخش دوم منحني‌های ۱ و ۲ پالسی، و بخش‌های اول و دوم منحنی ۲ پالسی است.

منابع

Dong H., Rothmel R., Onstott T.C., Fuller M.E., DeFlaun M.F., Streger Sh. H., Dunlap R., and Fletcher M.S. ۲۰۰۲. Simultaneous transport of two bacterial strains in intact cores from Oyster, Virginia: biological effects and numerical modeling. Applied and Environmental Microbiology, ۶۸: ۲۱۲۰-۲۱۳۲.

Unc, A. ۲۰۰۲. Importance of manure properties for the vadose zone transport and survival of manure bacteria. Ph.D. Thesis. Univ. Guelph, Guelph, Ont., Canada.

Abstract

Understanding bacterial transport in porous media is of great importance for successful implementation of bioremediation strategies in subsurface environments. In this study, the influence of pulse injection in two different times on Rhodococcus erythropolis transport through the sand columns wasevaluated under continuous unsaturated-saturated flow conditions. The input concentration equal to ۱.۳×۱۰۸ CFU ml-۱ was injected in ۱ and ۲ pulse injections. In the ۲-pulses treatment, the first pulse of bacteria was injected when the sand column was completely dry and as the saturated flow was established the second pulse was imposed. In the ۱-pulse treatment, the sand columns were treated with only one pulse in the beginning of the experiment. The effluent concentration of the bacteria was estimated using a calibration line relating concentration to the absorbance. The results showed that the type of the injected pulses would greatly affect the bacterial transport and the maximum concentrations of bacteria in both unsaturated and saturated conditions were observed in the beginning times when effluents arrived at the end of sand columns. The initial water content and the hydrophobicity of Rhodococcus erythropolis might be considered as two important factors affecting retention of the bacteria when the flow condition was changed from unsaturated to saturated.