بررسی اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به فنانترن توسط قارچ‌های مولد آنزیم لاکاز جداسازی شده از پالایشگاه تهران با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز

بهنام رجب‌پور اشکیکی[1]، حسینعلی علیخانی[2]، احمدعلی پوربابایی[3]، حسن سرشتی[4]

1،2،3- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تهران، دانشیار و استادیار گروه مهندسی علوم خاک دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران

4- استادیار پردیس علوم دانشگاه تهران

Email: brajabpour@ut.ac.ir

چکیده

در این تحقیق برای بررسی تخریب و متابولیسم ترکیب فنانترن از ایزوله قارچی ***Aspergillus RFB8*** جداسازی شده از خاک‌های آلوده پالایشگاه تهران و سویه استاندارد ***Phanerochaete chrysosporiumRP78*** استفاده گردید. پس از نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده، سری‌های رقت در محیط‌کشت‌های اختصاصی PDA و MEA کشت شده و قارچها طی چندین مرحله خالص‌سازی شدند. برای جداسازی قارچهای مولد آنزیم لاکاز از محیط کشت جامد حاوی سوبسترای ABTS برای رنگ سنجی استفاده گردید. تیمار آنزیم‌های خالص‌سازی شده به روش partial purification به عنوان مایه‌تلقیح در خاک‌های آلوده فنانترن با غلظت 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم تلقیح شدند. در طول 30 روز انکوباسیون، تغییرات pH و بیوماس قارچی ثبت گردید. بیشینه بیوماس قارچی برای سویه ***P.chrysosporiumRP78*** و ایزوله ***Aspergillus RFB8*** به ترتیب میزان 88 و 64 میلی‌گرم محاسبه گردید. پس از عصاره‌گیری خاک‌ها، آنالیزهای دستگاهی طیف‌سنجی مادون قرمز تخریب ساختار ترکیب فنانترن را اثبات نمودند. نتایج نشان داد که سویه ***P.chrysosporiumRP78*** که از قارچهای عامل پوسیدگی سفید بوده نسبت به ایزوله ***Aspergillus RFB8*** بومی خاک‌های آلوده نفتی پتانسیل تخریب زیستی بالاتری دارد.

کلمات کلیدی: اصلاح زیستی، آنزیم لاکاز، خاک، فنانترن، *Phanerochaete chrysosporium RP78*

مقدمه

آلودگی خاک‌ها در نتیجه فعالیت‌های مداخله‌گرایانه بشر در طبیعت، در مقایسه با گذشته افزایش قابل‌توجهی یافته است. از آلاینده‌های غالب زیست محیطی هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند که در این میان، ترکیبات هیدروکربنی آروماتیک حلقوی با توجه به پایداری بالا در محیط زیست، دارای اهمیت ویژه‌ای می باشند. شمار سایت‌هایی که نیازمند عملیات احیا و اصلاح می‌باشند تا سال 2025 به 50% افزایش خواهند یافت (USEPA,2008). در میان اغلب آلاینده‌های فراوان زیست محیطی، ترکیبات آروماتیک به دلیل پایداری و سمیت آن‌ها دارای بیشترین توجه و نگرانی می‌باشند. این ترکیبات در اثر سوختن و احتراق سوخت‌های فسیلی، سوزاندن پسماندها و بقایای زائد، پالایش نفت خام تولید می‌گردند (Atlas, R.M. 1995). بازیدیومایست‌های عامل‌پوسیدگی سفید در متابولیسم و تجزیه این آلاینده‌ها کارایی بالایی دارند. این قارچ ها با تولید سه گروه آنزیمی منگنزپراکسیداز، لیگنین‌پراکسیداز و لاکاز فرآیند تجزیه‌زیستی را تسریع می‌بخشند (Balba, M.T.,1998). اکسیداسیون تک الکترونی توسط این آنزیم‌ها، رادیکال‌های کاتیونی آلاینده‌ها را تولید می‌نماید. واکنش‌های شیمیایی مانند شکست و جداسازی کربن- کربن و عمل هیدروکسیلاسیون رادیکال‌های کاتیونی منجر به تشکیل محصولات با خصوصیت هیدروفیلیکی بیشتر می‌گردد

(Hammel, K.E. 1998). لاکاز یک پروتئین حاوی مس می‌باشد که اکسیداسیون طیف وسیعی از ترکیبات آروماتیک و غیرآروماتیکی را کاتالیز می‌نماید. لاکاز اکسیداسیون تک الکترونی را با تشکیل رادیکال‌هایی که در معرض واکنش‌های بعدی غیرآنزیمی قرار می گیرند، کاتالیز می‌نماید. اکسیداسیون بسیاری از ترکیبات آروماتیک بدون گروه‌های عامل واکنشگر توسط لاکاز، تقریباً غیرممکن می‌باشد. (Cerniglia et al,2001 ;Boonchan, S.,2002; Collins, P.J.,1996).

مواد و روشها

نمونه‌برداری خاک‌ها : نمونه‌برداری از عمق 10 سانتی‌متری خاک‌های آلوده نفتی سایت موجود در جنوب غربی پالایشگاه تهران از چندین نقطه سایت آلوده انجام شد که قارچ مورد بررسی از نقطه با مشخصات جغرافیایی $N\ 35^{o}$ 31´693 و ´987 24 $E\ 051^{o}$ و ارتفاع از سطح دریا 912 متر جداسازی گردید. **جداسازی قارچ‌ها** : به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌های قارچی، پس از تهیه محیط‌های کشت اختصاصی قارچی PDA و مالت اکستراکت آگار MEA ، سری‌های رقت (10^{-4} تا 10^{-9}) در درون محیط‌های جامد فوق تلقیح شدند و طی چند مرحله خالص‌سازی شدند. **سنجش آنزیمی قارچ های جداسازی شده مولد آنزیم لاکاز** : برای جداسازی قارچ‌های مولد آنزیم خارج سلولی لاکاز، ابتدا از روش رنگ‌سنجی استفاده گردید (Saparrat et al,2000) سویه‌های قارچی خالص شده را در محیط کشت MEA کشت تازه داده پس از رشد کافی هیف های قارچی، یک واحد پلاگ (یک مربع 5×5 میلی متر) از محیط MEA حاوی قارچ رشد کرده را توسط در محیط کشت مورد استفاده سوبسترای ABTS بکار گرفته شد تا با تغییر رنگ محیط به سبز آزمون آنزیم لاکاز انجام شود. محیط کشت برای سنجش آنزیم لاکاز حاوی معرف اکسیدازی ABTS: گلوکز (2گرم)، آمونیوم تارتارات (2گرم)، عصاره مالت (2گرم)، KH_2Po_4 (0/26 گرم)، ABTS (0/35 گرم)، Na_2HPo_4 (0/26 گرم)، $MgSo_4.7H_2o$ (0/5 گرم)، $CuSo_4.5H_2o$ (0/01 گرم)، $CaCl_2.2H_2o$ (0/006 گرم)، آگار (20 گرم)، $FeSo_4$ (0/005گرم)، Na_2MoO_4 (0/002 گرم)، $ZnSo_4.7H_2o$ (0/005 گرم)، $MnCl_2.2H_2o$ (0/09 گرم) و H_3Bo_3 (0/07گرم). (Kirk, T.K,1987).

سپس سویه‌های قارچی در محیط مایع Czapek Dox Broth با pH 5/0 درون ارلن مایرهای 250 میلی‌لیتری کشت شدند و روی شیکر با دور 120 و دمای 32 درجه سانتیگراد قرار گرفتند و در زمان های 24، 48، 72 و 120 ساعت محلول‌رویی فیلتر شده، و در دور 5/000 سانتریفیوژ گردیدند. تیمارهای آنزیمی میزان 5 میلی‌لیتر از محلول رویی میسلیوم‌های کشت شده درون محیط مایع بوده که پس از نیمه خالص‌سازی به روش partial purification توسط بافر درون ظروف شیشه‌ای محتوی 50 گرم خاک آلوده شده به 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم فنانترن تلقیح شده و برای مدت زمان 30 روز در شرایط تاریکی تحت دمای 28 درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند.

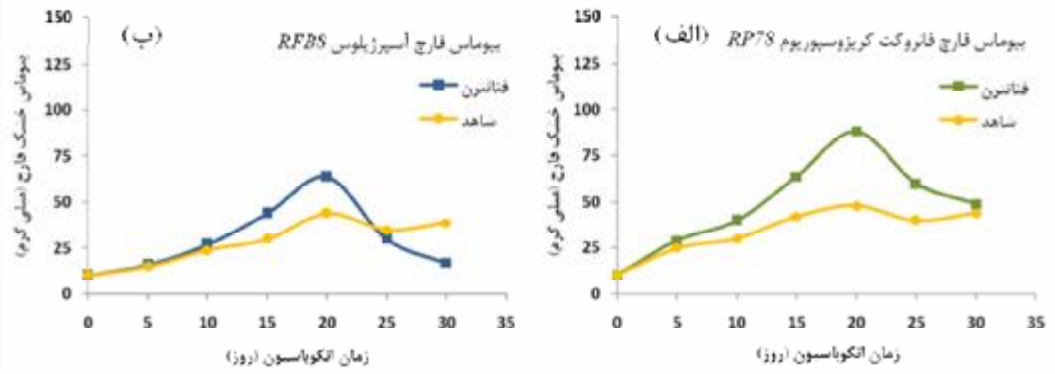
استخراج آلاینده ها از خاک برای آنالیز دستگاهی FTIR

برای استخراج و آنالیز ترکیب فنانترن از روش استخراج توسط ترکیب دو نوع حلال استون و دی‌کلرومتان با نسبت یک به یک استفاده گردید. یک گرم خاک را وزن کرده و درون ظروف ویال شیشه‌ای منتقل نمودیم، سپس یک گرم سولفات سدیم بدون آب و 10 میلی‌لیتر از دو ترکیب استون/دی کلرومتان به نسبت 1/1 اضافه شد. ظرف ویال برای مدت زمان 30 دقیقه با دور متوسط شیک گردید، سپس محلول نهایی دی‌فاز شده سانتریفیوژ شده و مجدداً با سولفات سدیم بدون آب آن را مخلوط کرده و پس از تبخیر مجدداً با حلال آن را حل نموده و برای آنالیز دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید.

نتیجه‌گیری

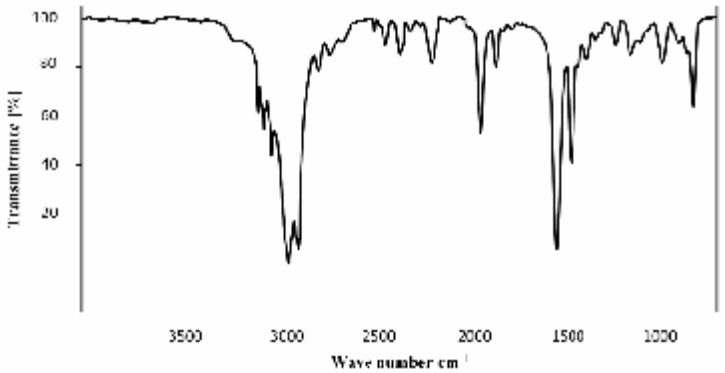
ایزوله‌های قارچی سویه *P.chrysosporiumRP78* و ایزوله *Aspergillus RFB8* در روزهای چهارم و هشتم به

ترتیب تغییر رنگ و اثبات تولید آنزیم لاکاز را نشان دادند که این نتایج و نیز سنجش آنزیمی در محیط مایع نشان از فعالیت آنزیمی بالاتر سویه استاندارد *P.chrysosporiumRP78* نسبت به *Aspergillus RFB8* داشته است. همانطور که در شکل 1 نشان داده شده بیوماس قارچی در مورد سویه *P.chrysosporiumRP78* در حضور ترکیب فنانترن در روز 20 انکوباسیون بیشینه بوده و میزان 88 میلی‌گرم و در مورد ایزوله قارچی *Aspergillus RFB8* جداسازی شده از پالایشگاه تهران میزان 64 میلی‌گرم محاسبه شده است. بیوماس بالاتر نشان از قدرت بالاتر سویه استاندارد *RP78* در متابولیسم ترکیب فنانترن دارد.



شکل 1 – تغییرات بیوماس قارچ‌ها الف) *P.chrysosporiumRP78* ب) *Aspergillus RFB8* در مدت 30 روز انکوباسیون

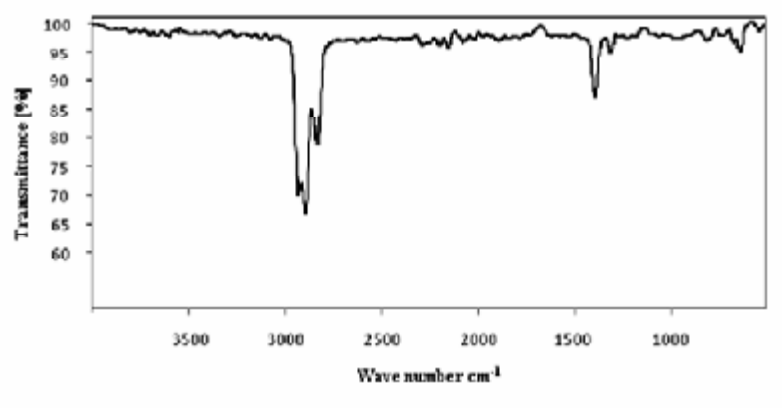
مطابق شکل 2 طیف مادون قرمز نمونه شاهد فنانترن 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم، جذب در طول موج $1598/21cm^{-1}$ نشانه پیوندهای C=C در حلقه آروماتیک می‌باشد. همچنین جذب نسبتاً بالا در طول موج $725/51cm^{-1}$ و cm^{-1} 891/59 به ترتیب مربوط به پیوندهای C-H خمشی خارج صفحه‌ای در ارتباط با فنانترن و پروتون‌های متصل به حلقه می‌باشند. پیوند C-H کششی نیز در ترکیب فنانترن در طرف چپ طول موج $3000\ cm^{-1}$ قرار دارد.



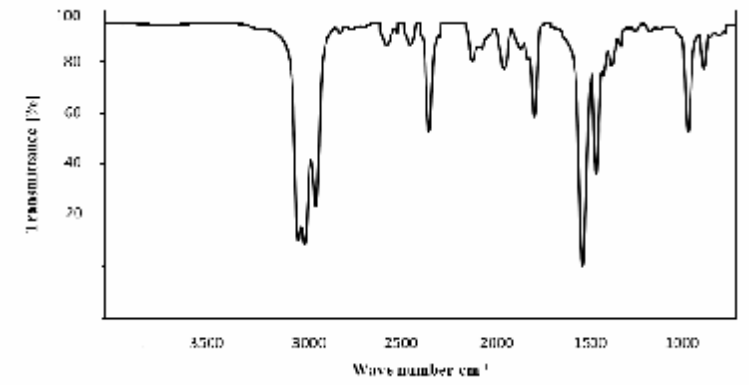
شکل2- طیف مادون قرمز نمونه شاهد ترکیب هیدروکربنی آروماتیک سه‌حلقه‌ای فنانترن

در شکل3 طیف مادون قرمز نمونه خاک آلوده به فنانترن تیمار شده با محلول آنزیمی لاکاز قارچ *P.chrysosporiumRP78* در مقایسه با نمونه شاهد حذف غالب جذب‌های مربوط به پیوندهای C-H کششی و خمشی را به خوبی نشان داده شده است. اما طیف مادون قرمز در روز 30 انکوباسیون در مورد نمونه خاک تیمار شده با محلول آنزیمی لاکاز قارچ *Aspergillus RFB8* تنها اندکی بر پیوند کربن- کربن حلقه آروماتیک اثر تخریبی نمایش داده است. نتایج آنالیزهای دستگاهی نشان از متابولیسم و قدرت اکسیدکنندگی بالاتر آنزیم لاکاز متعلق به سویه

استاندارد *RP78* که از قارچ‌های بازیدیومایست و عامل پوسیدگی سفید می‌باشد در مقایسه با ایزوله *RFB8* داشته و نشان می‌دهد که لزوماً میکروارگانیسم‌های بومی سایت‌های آلوده دارای بیشترین قدرت در تجزیه و متابولیسم ترکیبات موجود در خاک‌ها نمی‌باشند. (Wang, 2004).



شکل3- طیف مادون قرمز نمونه خاک حاوی تیمار آنزیم لاکاز *Phanerochaete Chrysosporium RP78*



شکل4- طیف مادون قرمز نمونه خاک حاوی تیمار آنزیم لاکاز *Aspergillus RFB8*

منابع

موثق ب، 1388. نگرشی بر طیف‌سنجی (ترجمه). انتشارات علمی و فنی.

Atlas RM,1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. Mar.Pollut. Bull. 31: 178–182.

Balba MT, Al-Awadhi N, Al-Daher R, 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J. Microbiol. Methods 32: 155–164.

Boonchan S, Britz ML, Stanley GA, 2002. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal– bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol 66: 1007–1019.

Cerniglia CE, Sutherland JB, 2001. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In: Fungi in Bioremediation, G.M. Gadd, ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp.136–187.

Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW, 1996. Oxidation of anthracene, phenanthrene and benzo[a]pyrene by laccases from Trametes versicolor. Appl. Environ. Microbiol 62: 4563–4567.

Hammel KE, 1998. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. Environ. Health Perspect. 103: 41–43.

Kirk, T.K. and Farrell, R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41, 465-505.

Saparrat MCN, Martinez MJ, Tournier HA, Cabello MN, Arambarri AM, 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. Rev Iberoam Micol, 17: 64-68.

United States Environmental Protection Agency, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)," January 2008,http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm

Wang J Y, Stabnikova O, Lee S S & Tay J H, 2004. Integrated chemical-biological remediation for polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil, practice periodical of hazardous, Toxic Radioact Waste Manage, (8) 79.