مجله تحقیقات آب و خاک ایران (۴۳) ۴، ۱۳۹۲ (۳۳۳-۳۲۵)

توانایی تجزیه زیستی فنانترن توسط سویه باکتریایی شوردوست جداسازی شده از خاک شور و سدیمی آلوده به پسماند نفت خام منطقه سراجه قم

ملک حسین شهریاری[۱]*، غلامرضا ثواقبی فیروزآبادی[۲]، احمدعلی پوربابایی[۳]
[۱]دانشجوی دکتری، [۲]استاد، [۳]استادیار، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی،
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۸/۲۰)

چکیده

بیشتر هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای از انواع آلاینده‌های جهش‌زا و دارای پتانسیل سرطان‌زایی می‌باشند. اگر چه چندین سویه تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در شرایط طبیعی تشخیص داده شده‌اند، اما در این تحقیق، تجزیه فنانترن به عنوان مدلی از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در شرایط شور توسط سویه جدیدی از باکتریایی شوردوست *Halobacillus dabanensis* (سویه Q-SH1) مطالعه گردید. این سویه باکتریایی دارای توانایی تجزیه فنانترن، از نمونه‌های خاک شور و سدیمی آلوده به پسماندهای نفت خام از منطقه بهره برداری نفت و گاز سراجه قم جداسازی گردید. آزمایش‌های متعدد بر اساس صفات شکلی و بیوشیمیایی و آنالیز توالی ژن 16S rDNA نشان داد که این جدایه با *Halobacillus dabanensis* ۹۹/۸ ٪ تشابه دارد. سویهQ-SH1 در طی ۱۰ روز، توانایی تجزیه ۸۳ درصد فنانترن در محلول با شوری ۱۰ درصد و حاوی غلظت $40\ mg\ L^{-1}$ فنانترن را داشت. شرایط بهینه برای رشد سویه-Q SH1، pH ۷/۶، دمای C° ۳۷ و شوری ۱۰ درصد تعیین گردید. نتایج نشان داد که سویه Q-SH1 توانست فنانترن را در گستره وسیعی از غلظت نمک (۰/۵ تا ۲۷ %) تجزیه نماید.

واژه های کلیدی: باکتری شوردوست، تجزیه زیستی، خاک شور و سدیمی، فنانترن

مقدمه

نفت خام یا مشتقات آن در طی مراحل اکتشاف، بازیافت، تولید، پالایش، انتقال و ذخیره سازی ممکن است به محیط زیست وارد شوند و منجر به آلودگی خاک ها و آب دریاها گردند بنابراین وجود و رهاسازی این چنین ترکیباتی می‌تواند بر سلامت بشر و محیط زیست تاثیرات سوئی داشته باشد. هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای یک گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات نفتی را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات معمولا در طی سوختن ناقص مواد آلی تشکیل می‌شوند بنابراین در غلظت‌های نسبتا زیادی در مشتقات حاصل از پالایش سوخت‌های فسیلی یافت می‌شوند (Nishloka *et al*., 1986) . فنانترین از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای اصلی مورد توجه می‌باشد و از آنجایی که ساختار شیمیایی آن در ساختار ترکیبات سرطان‌زا مانند بنزو (آ) پایرین وجود دارد به عنوان یکی از ترکیبات شاخص جهت تعیین آلودگی بکار می‌رود و در مطالعات مربوط به تجزیه زیستی به عنوان مدلی از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که بسیاری از ذخایر نفتی جهان در مناطق خیلی شور قرار دارند (Aizenshtat *et al*. 1999) و استخراج نفت خام نیز با آب‌های شور همراه می‌باشد بنابراین بسیاری از مناطق آلوده به نفت خام و مشتقات آن‌ها با معضل شوری مواجه هستند. در اکثر موارد زیست پالایی راهکار اصلی برای حذف آلاینده های آلی می‌باشد (Sepic *et al*.,1998). اگرچه بسیاری از فرایندهای اصلاح زیستی در شرایط طبیعی قابل درک می‌باشد اما اطلاعات مربوط به تجزیه زیستی توسط میکروب‌های شوردوست نادر و مشکلات زیادی هنوز لاینحل باقی مانده است. تاثیر شوری بر تجزیه هیدروکربن‌ها بوسیله سویه‌های جدا شده و کنسرسیوم میکروبی توسط محققین متعددی بررسی گردید (Mille *et al*. 1991; Diaz *et al*. 2002; Riss *et al*. 2003; Zhao *et al*. 2009; McGenity 2010.). Diaz *et al* (2002) گزارش دادند که تجزیه میکروبی فنانترن در شوری ۴ درصد حداکثر می‌باشد. Zhao *et al* (2009) نیز گزارش دادند که بیشترین تجزیه فنانترن توسط کنسرسیوم میکروبی شور دوست (*Marinobacter flavimaris*, *Halomonas salina*, *Alcanivorax* sp.) در شوری ۵ درصد انجام گرفت و با افزایش و کاهش میزان شوری، میزان تجزیه زیستی فنانترن توسط کنسرسیوم میکروبی شور دوست کاهش یافت. سویه

* پست الکترونیک مکاتبه کننده: shahriari396@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

Ochrobactrum sp. VA1 توانایی تجزیه ۹۲ درصد فنانترن با غلظت $3\ mg\ L^{-1}$ در شوری۳ درصد NaCl را نشان داد اما با افزایش شوری به ۶ درصد، تجزیه فنانترن کاهش یافت (Arulazhagan and Vasudevan, 2011). این نتایج نشان می-دهد که در اکثر موارد، شوری به شدت بر تجزیه زیستی تاثیرگذار بوده است و تنها در شوری کم و یا در گستره محدودی، باکتری توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها را داشته است. سرعت کاهش و حذف طبیعی هیدروکربن‌های آروماتیک در محیط‌های شور کم می‌باشد (McGenity 2010) . با افزایش میزان شوری، تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها به دلایل مختلفی از جمله کاهش فعالیت میکروبی،کاهش زیست فراهمی آلاینده‌ها، کمبود میزان اکسیژن محلول(Whitehouse 1984) و کاهش تعداد و نوع سوبسترای مورد استفاده (Riis *et al.*, 2003) کاهش می‌یابد. علاوه بر آن ممکن است در شرایط شوری زیاد، آبدوستی سطح سلول ریزجانداران شوردوست افزایش یابد (Hart and Vreeland 1988) که این امر اتصال و نزدیکی سلول‌های میکروبی به هیدروکربن‌ها که معمولا آبگریز هستند را کاهش می‌دهد. در شرایط شور میکروب‌ها از تنش اسمزی زیان می‌بینند که ناشی از خشک شدن و تحلیل رفتن سلول‌هاست. با این وجود برخی از ریزجانداران خاک توانایی سازگاری و تحمل تنش اسمزی ناشی از خشکی و شوری را دارا هستند، بویژه زمانی‌که مرتبا در معرض چنین شرایطی باشند (Sparling *et al.*, 1989). از آنجایی که جداسازی و شناسایی باکتری‌های شوردوست و بررسی تاثیر برخی از عوامل محیطی بر آن‌ها می‌تواند به عنوان راهکار مناسبی جهت استفاده از پتانسیل محیط‌های آلوده جهت اصلاح آنها باشد. لذا این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی تاثیر شوری، دما و غلظت فنانترن بر تجزیه زیستی آن توسط سویه باکتریایی شوردوست انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از خاک

نمونه برداری از ۴ خاک شور و سدیمی آلوده به نفت خام در منطقه بهربرداری نفت و گاز سراجه قم در ایران انجام گردید (جدول ۱). خاک‌های آلوده از عمق۰ تا ۳۰ سانتیمتری از سطح خاک نمونه برداری گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای$4^{\circ}C$ نگهداری شدند. پارامترهای مهم خاک شامل EC، pH، درصد رطوبت اشباع، غلظت کاتیون-های غالب خاک شامل سدیم، کلسیم، منیزیم و پتاسیم و آنیون های مهم شامل کلر، سولفات، کربنات و بیکربنات با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری گردید (Sparks, 1996) (جدول ۲) و بر اساس آن محیط کشت مورد نیاز جهت جداسازی باکتری‌های شور دوست انتخاب شد.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مکان های نمونه برداری و مدت زمان آلودگی

محل دفن پسماند	مختصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا(متر)	مدت زمان آلودگی (سال)	نمونه های خاک
۱	N ۳۴ ۳۰' ۴/۴"	۸۲۶	۱	۱و۲
	E ۵۱ ۱۶' ۳۰/۴"			
۲	N ۳۴ ۲۹' ۳۸/۷"	۸۲۲	۱۰	۳و۴
	E ۵۱ ۱۶' ۵۵/۰"			

جدول۲- 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 ($dS\ m^{-1}$)	pH	SAR	SP (%)
	($meq\ l^{-1}$)											
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

غنی سازی و جداسازی باکتری‌های شورپسند دارای توانایی تجزیه فنانترن از خاک‌های شور

از خاک شور و سدیمی آلوده به پسماندهای نفت خام جهت نمونه برداری استفاده شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در دمای$4^{\circ}C$ نگهداری شدند. به همین منظور ۱۰ گرم از خاک آلوده به نفت خام به فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری

Archive of SID
www.SID.ir

حاوی ۱۰۰میلی لیتر از محیط کشت تغییر یافته McGenity (2010)(جدول ۳) دارای ۸۰mg L^{-1} فنانترن اضافه گردید و سپس به مدت ۷ روز روی شیکر با دور۱۵۰rpm و دمای ۳۷ $^{\circ}C$ گرماگذاری شد. جهت تکمیل فرایند غنی سازی، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت غنی شده به ۹۰ میلی لیتر از محیط کشت نمکی تازه دارای تمام شرایط قبل انتقال داده شد و این عمل حداقل ۸ بار تکرار گردید. به منظور جداسازی جدایه‌ها، پس از مشاهده کدورت، از محیط کشت غنی سازی شده نهایی سری رقت تهیه گردید و به پلیت‌های نوترینت آگار دارای ترکیب نمکی محیط کشت انتقال داده شد و پس از گرماگذاری در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ ، سویه‌های رشد یافته از محیط کشت جامد جداسازی گردیدند.

جدول۳- ترکیبات محیط کشت تغییر یافته (McGenity (2010

اجزاء	مقادیر
NaCl	g۸۲/۸۵
$MgCl_2.6H_2O$	g۲۴/۱
KCl	g۲/۵۳
Na_2SO_4	g۲/۱۸
Tris-HCl(1M;pH 7.6)	ml۲۰
عصاره مخمر	g۲
محلولB تهیه شده در ۱۰۰ml آب مقطر	
اجزاء	حجم(ml)
H_3BO_3(400mM)	۰/۶
$SrCl_2$(400mM)	۰/۷
NaF(70mM)	۰/۷
NH_4Cl(500mM)	۱
KH_2PO_4(100mM)	۱
Trace element solution SL-10:	۲
محلولC تهیه شده در ۱۰۰ml آب مقطر	
اجزاء	حجم(ml)
$CaCl_2.2H_2O$ (1M)	۱۰ ml

(هر سه محلول جداگانه اتوکلاو و پس از سرد شدن مخلوط شدند)

غربالگری باکتری‌های قابل رشد در محیط حاوی فنانترن

سویه‌های خالص جداسازی شده از مراحل غنی سازی با فنانترن، با دو روش spray-plated و اندازه گیری کدورت محیط کشت حاوی فنانترن، مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش spray-plated، محلول استون حاوی یک درصد فنانترن بر روی پلیت‌های محیط کشت حاوی آگار اسپری شد. بعد از تبخیر حلال، جدایه ها بر روی پلیت نقطه گذاری و در ۳۷$^{\circ}C$ گرماگذاری گردیدند. ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی جدای‌های رشد یافته در محیط حاوی فنانترن، به عنوان جدایه مثبت در تجزیه فنانترن ثبت گردید (Kumar et al.,2008).

در روش کدورت، ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از جدایه‌های رشد یافته بر روی پلیت‌های نوترینت آگار (معادل ۰/۵ مک فارلند) به لوله‌های حاوی محیط کشت استریل شده دارای ۱۰ میلی لیتر از محیط نمکی و ۸۰۰ میکروگرم فنانترن تلقیح و سپس در محیط تاریک درگرمخانه شیکر دار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷$^{\circ}C$ به مدت ۱۰ شبانه روز گرماگذاری شد. مشاهده کدورت ناشی از رشد جدایه‌ها به عنوان جدایه تجزیه کننده فنانترن انتخاب گردیدند.

ارزیابی تجزیه زیستی فنانترن در باکتری های مقاوم به شوری

به مقدار یک میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از جدایه‌های رشد یافته در محیط کشت مایع با مکمل فنانترین (با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند)، به لوله های آزمایش حاوی۱۰ میلی لیتر محیط کشت نمکی و ۴۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره فنانترن (۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر استون) پس از تبخیر حلال تلقیح شدند و در۳۷ $^{\circ}C$ در محیط تاریک به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. جهت تهیه نمونه برای آنالیز با دستگاه های اسپکتوفتومتری و HPLC ، ابتدا محتویات لوله های آزمایش با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت استخراج فنانترن بر روی محلول رویی جدا شده، ۱۰ میلی لیتر n- هگزان اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. در نهایت فاز آلی آبگیری شده با سولفات سدیم بدون آب جهت تعیین غلظت فنانترن باقی مانده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه گیری و نتایج حاصل از آن با دستگاه HPLC تائید گردید (Kelley *et al*, 1991).

بررسی تاثیر شوری، دما و غلظت فنانترن بر میزان تجزیه فنانترن توسط جدایه برتر

جهت تعیین تاثیر غلظت‌های مختلف شوری بر تجزیه فنانترن، به میزان ۵ درصد حجمی از جدایه برتر رشد یافته در محیط حداقل با مکمل فنانترن با کدورت معادل۰/۵مک فارلند، به محیط کشت تغییر یافته McGenity 2010 در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ ،۲۰، ۲۵و ۲۷ درصد نمک) حاوی ۴۰mg L^{-1} فنانترن تلقیح گردید و پس از گرماگذاری و استخراج نمونه‌ها، توانایی باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن برای تجزیه فنانترن در غلظت‌های مختلف نمک آزمایش شدند. لازم به ذکر می باشد که منظور از درصدهای نمک مخلوطی از ۴ نمک , $MgCl_2.6H2O$, NaCl, Na_2SO_4, KCl با نسبت های ارائه شده در جدول شماره ۳ می باشد. برای بررسی تاثیر دما از

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت بهینه ۱۰ درصد شوری و غلظت ۴۰mg L^{-1} فنانترن در دماهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۵۲°C) استفاده شد. جهت بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف فنانترن نیز شوری ۱۰ درصد و دمای ۳۷ °C انتخاب و از غلظت‌های ۴۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر فنانترن به عنوان منبع کربن در محیط کشت تغییر یافته McGenity 2010 استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار و برای نمونه شاهد از سلول‌های اتوکلاوشده استفاده شد. با گذشت ۱۰ روز از شروع آزمایش، با حلال n- هگزان از محیط کشت، عصاره گیری و پس از آبگیری با سولفات سدیم بدون آب، غلظت فنانترن باقی مانده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه گیری گردید.

شناسایی جدایه باکتریایی

ویژگی های فیزیولوژیک و شکلی جدایه منتخب بر روی محیط نوترینت براث حاوی نمک بهینه و محیط دارای آگار مطالعه بر طبق کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی انجام شد. نیازهای غذایی جدایه بر محیط Koser (۱۹۲۳) شامل: آمونیوم دهیدروژن فسفات ۱g L^{-1} ، کلرید سدیم ۵۰ g L^{-1}، نمک اسیدهای الی ۲۰g L^{-1}، سولفات منیزیم ۲/. g L^{-1} ، آگار g L^{-1} ۱۵، برموتیمول بلو ۰۸/. g L^{-1} بررسی گردید. استخراج DNA ژنومیک مطابق روش *Pospiech* and *Neumann* (۱۹۹۵)، در مرکز ذخایر زیستی انجام شد. تعیین توالی 16S rDNA توسط شرکت ماکروژن در کره جنوبی (بوسیله سیستم ABI مدل 3730XL) انجام گردید.

اندازه گیری آبگریزی سلول، کشش سطحی محیط کشت و شاخص امولسیون کنندگی

با توجه به نقش سورفکتانت‌های زیستی در افزایش زیست فراهمی آلاینده‌های هیدروکربنی آبگریز و تجزیه زیستی آن‌ها، از آزمون چسبندگی باکتریایی به هیدروکربن‌ها (BATH) به منظور اندازه‌گیری آبگریزی سلول‌ها استفاده شد. سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ کردن محیط کشت در دور ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C و دوبار شستشو با محلول نمکی بدست آمد. سلول‌ها در محلول نمکی بافر (pH= 7) حاوی ۱۶/۹ گرم K_2HPO_4، ۷/۳ گرم KH_2PO_4، ۱/۸ گرم اوره و ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$ در لیتر، برای رسیدن به کدورت (OD) ۰/۳ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، نگهداری شدند. ۳ میلی لیتر از محیط کشت و به همان حجم هیدرورکربن مربوطه به لوله های آزمایش منتقل و پس از گذشت ۵ دقیقه بوسیله ورتکس در دور بالا به مدت ۶۰ ثانیه مخلوط گردیدند . محتویات لوله آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس کدورت (OD) آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از معادله زیر درصد آبگریزی محاسبه گردید. در واقع درصد سلول انتقال یافته به درون فاز هیدروکربنی بیانگر درصد آبگریزی سطح سلول می‌باشد (Rosenberg *et al*., 1985).

$$\left(1-\frac{\text{تراکم نوری مایع در 600 نانومتر}}{\text{تراکم نوری اولیه مایع در 600 نانومتر}}\right)\times 100 = \text{درصد سلول انتقال یافته به درون هیدروکربن}$$

شاخص امولسیون کنندگی (E24) بوسیله اافزودن هیدروکربن مناسب به همان مقدار از محیط کشت مایع بدون سلول انجام شد از هیدروکربن‌های کروزن، بنزن، n-هگزان و تولوئن برای اندازه‌گیری شاخص امولسیون کنندگی استفاده شد. ۴میلی لیتر از محیط کشت فاقد سلول به لوله‌های آزمایش منتقل و ۶ میلی لیتر هیدروکربن مربوطه به لوله ها افزوده شدند. محتویات درون لوله ها به مدت ۲ دقیقه با ورتکس در دور بالا مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. از تقسیم ارتفاع لایه امولسیون (میلی متر) به ارتفاع کل ستون مایع (میلی متر) شاخص امولسیون کنندگی برحسب درصد بیان شد. کشش سطحی محیط کشت بدون سلول در زمان‌های مختلف پس از تلقیح باکتری به محیط حاوی فنانترن توسط دستگاه تنسیومتر مدل KRUSS اندازه گیری گردید (Rosenberg *et al* 1985).

تمام آزمایشات با سه تکرار انجام گردید و از میانگین داده‌ها و استاندار خطا جهت تفسیر نتایج استفاده گردید.

نتایج و بحث

مشخصات سویه باکتری

تعداد ۲۱ جدایه باکتریایی از خاک‌های شور آلوده به نفت خام منطقه بهره برداری نفت و گاز سراجه قم جداسازی گردید. این مکان بهربرداری به دلیل شوری بالای خاک آن و وجود گودال های حاوی پسماند نفت خام حایز اهمیت می‌باشد. سویه Q-SH1 جداسازی شده از خاک شور شماره ۱ از بین جدایه های بررسی شده با توجه به نتایج میزان تجزیه فنانترن در طی مدت ۱۰ روز از انجام آزمایش به دلیل توانایی بیشتر در تجزیه فنانترن برای مطالعه بیشتر انتخاب گردید. سویه Q-SH1 میله ای، گرم مثبت، دارای توانای رشد در شرایط هوازی و بی هوازی بوده و همچنین این جدایه دارای توانایی تجزیه قندهای گلوکز، مالتوز و آرابیتوز می‌باشد. سویه Q-SH1 در محدوده دمایی ۱۰ تا ۵۲°C و در شوری ۰/۵ تا ۲۷ درصد، توانایی تجزیه فنانترن را نشان داد. همچنین این سویه قادر به رشد در محدوده pH ۵/۵ تا ۹/۵ بود. آزمایشات تعیین خصوصیات بیوشیمیایی بر طبق مندرجات کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی و نیز نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان داد که سویه Q-SH1 به میزان ۹۹/۸ ٪ با سویه D-8(T) از

Archive of SID

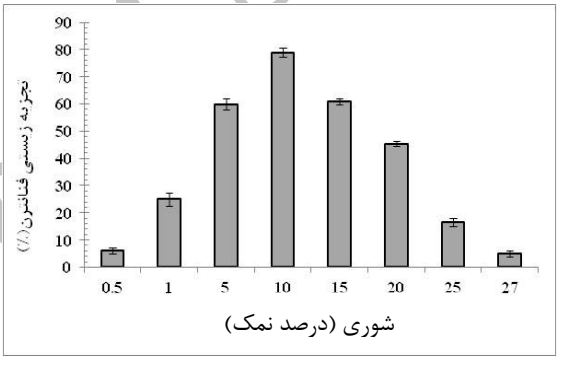
www.SID.ir

Halobacillus dabanensis با شماره دسترسی AY351395 قرابت فیلوژنی دارد و تحت شماره JQ305105 در GenBank ثبت گردید.

تاثیر شوری بر تجزیه زیستی

سویه Q-SH1 توانایی تجزیه فنانترن در طیف وسیعی از شوری از ۱ تا ۲۷ درصد را داشت. اگر چه در بسیاری از مطالعات غلظت NaCl به عنوان درصد نمک در نظر گرفته شده است (Ventosa et al.,1998) اما در این مطالعه مخلوطی از نمک‌ها که معمولا در خاک‌های شور یافت می‌شوند مورد استفاده قرار گرفت. چرا که در نظر گرفتن چندین نمک به شرایط طبیعی خاک ها نزدیک تر است.

این تحقیق نشان داد بیشترین درصد تجزیه فنانترن در غلظت ۱۰ درصد نمک صورت گرفت و با افزایش و کاهش شوری نسبت به شوری ۱۰ درصد، تجزیه فنانترن کاهش یافت (شکل ۱).

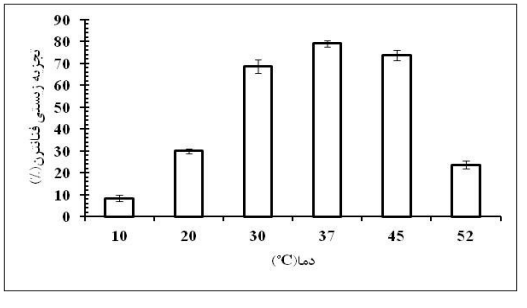


شکل ۱- تاثیر درصدهای مختلف نمک (شوری) بر درصد تجزیه فنانترن توسط سویه Q-SH1 در غلظت ۴۰mgL^{-1} در دمای ۳۷°C پس از ۱۰ روز . خطوط خطا بیانگر خطای استاندارد در سه تکرار آزمایش می‌باشد

با این وجود نتایج نشان داد که این سویه توانایی نسبتا بالایی در تجزیه فنانترن در ۵ و ۱۵ درصد نمک را نیز دارا می‌باشد اما در سایر غلظت‌های نمک میزان تجزیه فنانترن به صورت معنی داری کاهش یافت. کلنی‌های تشکیل شده در شوری ۰/۵، ۱، ۲۰، ۲۵ و ۲۷ درصد شوری کوچک تر از کلنی های تشکیل شده در محیط دارای شوری ۱۰،۱۵ و ۵ درصد بود و بزرگترین کلنی ها در ۱۰ درصد شوری تشکیل شد. میکروب‌های شور دوست در آب‌های شور، خاک‌های شور و دریاچه‌ها یا حوضچه‌های نمک به تعداد زیاد یافت می‌شوند. با وجود اینکه میکروب‌ها درمحدوده وسیعی از محیط‌های خیلی سخت یافت شده‌اند اما توانایی آنها در تجزیه ترکیبات آلاینده محیط به خوبی مطالعه نشده‌اند. باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها توانایی تجزیه نفت خام را در غلظت ۳۰ g L^{-1} NaCl از دست می‌دهند (Kapley *et al*. 1999). به عبارت دیگر رابطه عکسی بین شوری و تجزیه هیدروکربن‌ها گزارش شده است. *et al* Diaz (2002) گزارش کردند که تجزیه میکروبی فنانترن در شوری ۴ درصد حداکثر می‌باشد. Zhao *et al* (2009)، گزارش کردند بیشترین تجزیه فنانترن توسط مجموعه‌ای از میکروب‌های شور دوست در شوری ۵ درصد انجام گرفت و با افزایش و کاهش شوری، تجزیه زیستی فنانترن توسط کنسرسیوم میکروبی شور دوست کاهش یافت. سویه *Ochrobactrum* sp. VA1 توانایی تجزیه ۹۲ درصد فنانترن با غلظت ۳ mg L^{-1} فنانترن در شوری ۳ درصد کلرید سدیم را نشان داد اما با افزایش شوری به ۶ درصد، تجزیه فنانترن توسط همان سویه کاهش یافت(Arulazhagan and Vasudevan,2011).

تاثیر دما بر تجزیه زیستی فنانترن

تاثیر دماهای مختلف بر تجزیه زیستی فنانترن توسط سویه Q-SH1 در طیف دمایی ۱۰°C تا ۵۲°C بررسی شد (شکل۲). نتایج نشان داد بیشترین تجزیه زیستی در ۳۷°C بود. در دمای ۴۵°C تجزیه زیستی به طور جزئی کاهش یافت که این کاهش اختلاف معنی داری با دمای ۳۷°C نداشت. اما در ۳۰°C تجزیه فنانترن به طور معنی داری کاهش یافت. Mille (1991) *et al* و Kumar *et al* (2007) تجزیه هیدروکربن ها در محدوده دمایی محدودتری (۴۵°C-۳۰ °C) گزارش کردند. توانایی تجزیه زیستی فنانترن توسط سویه مذکور در محدوده 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 دمای نسبتا بالا (۴۵°C-۳۷°C) از دوجنبه حائز اهمیت می‌باشد از یک طرف در اکثر مناطق نفت خیز ایران و عمده کشورهای بزرگ تولید کننده نفت خام در طی تابستان دما بالا می‌باشد، از طرف دیگر با افزایش دما انحلال پذیری هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای در آب افزایش پیدا می‌کند و در نتیجه زیست فراهمی‌آنها برای میکروب های تجزیه کننده آلاینده ها افزایش می‌یابد و در نهایت می‌تواند منجر به افزایش سرعت تجزیه زیستی آن‌ها گردد.

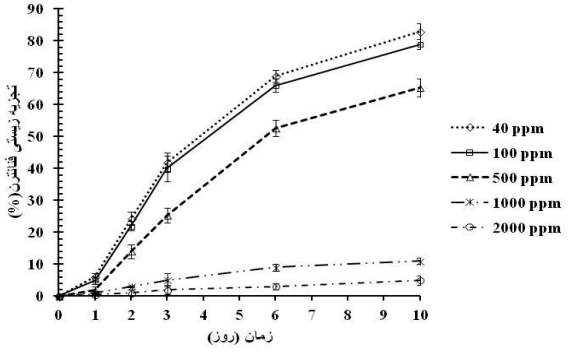


شکل ۲ - تاثیر دماهای مختلف بر تجزیه فنانترن توسط سویهQ-SH1

Archive of SID
www.SID.ir

تاثیر غلظت های متفاوت فنانترن بر تجزیه آن

تجزیه فنانترن توسط سویه Q-SH1 ابتدا از طریق تشکیل هاله شفاف بر روی محیط کشت جامد حاوی فنانترن اثبات گردیده . Kumar و همکاران (2008) تایید نمودند که رشد باکتری و تشکیل هاله شفاف بر روی پلیت آگار- آگار حاوی هیدروکربن نشان دهنده استفاده از هیدروکربن به عنوان منبع کربن می‌باشد. توانایی این سویه در استفاده از فنانترن با افزایش رشد باکتری همراه با کاهش غلظت فنانترن در محیط کشت مایع تغییر یافته McGenity 2010 بیشتر اثبات گردید. سویه Q-SH1 توانست در شوری ۱۰ درصد در طی مدت ۱۰ روز، فنانترن را در غلظت‌های مختلفی ($40\ mg\ L^{-1}$، $100\ mg\ L^{-1}$ و $500\ mg\ L^{-1}$) به صورت چشمگیری کاهش دهد. نتایج نشان داد که ۸۳ درصد فنانترن در غلظت $40\ mg\ L^{-1}$ در مدت ۱۰ روز توسط سویه Q-SH1 تجزیه شد (شکل ۳). اما با افزایش غلظت فنانترن درصد تجزیه آن توسط همین سویه کاهش پیدا کرد.



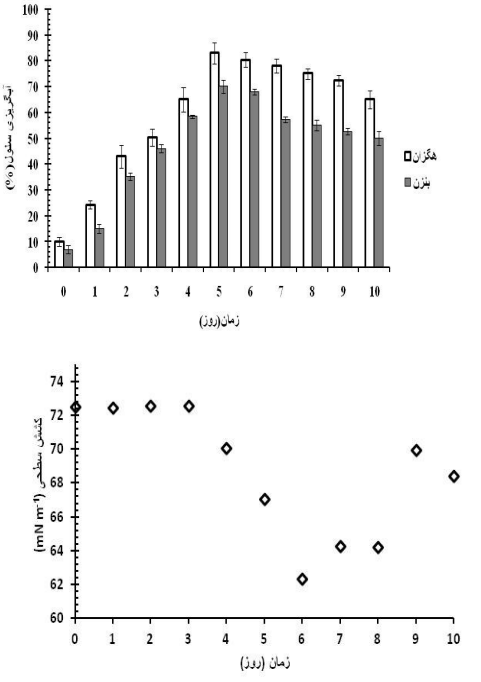
شکل ۳- سینتیک تجزیه زیستی فنانترن در غلظتهای مختلف توسط سویه Q-SH1 در دمای $37^{\circ}C$

سایر محققین نیز گزارش کردند که با افزایش غلظت فنانترن درصد تجزیه آن کاهش می‌یابد. به عنوان مثال (Arulazhagan and Vasudevan ,2009) بیان کردند که با افزایش غلظت فنانترن از $20\ mg\ L^{-1}$ به $50\ mg\ L^{-1}$ و $100\ mg\ L^{-1}$، تجزیه فنانترن به ترتیب ۶ و ۲۱ درصد نسبت به غلظت $20\ mg\ L^{-1}$ در مدت ۴ روز دوره آزمایش توسط مجموعه میکروبی در شوری ۳ درصد کاهش یافت. اگرچه با افزایش غلظت آلاینده درصد تجزیه آن کاهش یافته است اما با افزایش غلظت فنانترن از $40\ mg\ L^{-1}$ به $500\ mg\ L^{-1}$ 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 $1000\ mg\ L^{-1}$ سرعت تجزیه فنانترن نسبت به غلظت‌های کمتر کاهش یافت که احتمالا به دلیل سمیت ناشی از غلظت‌های زیاد فنانترن برای این سویه می‌باشد. بیشترین سرعت تجزیه فنانترن در غلظت $500\ mg\ L^{-1}$ در طی ۶ روز بوده است ($43/9 mg\ L^{-1} day^{-1}$). با گذشت زمان سرعت تجزیه کاهش یافت که ممکن است به دلیل تولید متابولیت‌های سمی در طی فرآیند تجزیه باشد. سویه *Burkholderia cocovenenans* (BU-3) بیش از ۹۵ درصد فنانترن را در مدت ۱۶ روز در غلظت‌های $100 mg\ L^{-1}$ و $500\ mg\ L^{-1}$ کاهش داد. با افزایش غلظت فنانترن به $1000\ mg\ L^{-1}$ ، ۶۵ درصد آن تجزیه گردید (Wong *et al*.,1999). این محققین بیشترین سرعت تجزیه فنانترن را ۴/۲ میلی گرم بر ساعت در طی ۲ تا ۴ روز از شروع آزمایش گزارش کردند. تجزیه فنانترن با سرعت ۲/۹ تا ۳/۳ میلی گرم در ساعت توسط *Mycobacterium* sp. انجام شد (Boldrin *et al*., 1993; Tiehm, 1994). محققین گزارش دادندکه سویه H-28 از *Halomonas eurihalina* قادر است ۵۰ درصد فنانترن را در غلظت $51/3\ g\ L^{-1}$ کلرید سدیم تجزیه نماید.(Martínez-Checa *et al*., 2002) . Al-Mailem و همکاران (2010) گزارش کردند که ۴ جدایه آرکئا شوردوست توانایی تجزیه تنها ۱۳ تا ۳۰ درصد فنانترن بسته به نوع و شرایط پس از ۳ هفته از شروع آزمایش را دارند.

اندازه گیری کشش سطحی، آبگریزی سطح سلول و شاخص امولسیون کنندگی

نتایج نشان داد که شاخص امولسیون کنندگی در محلول فاقد سلول قابل توجه نبود. مقادیرکشش سطحی در محیط بدون سلول باکتری نیز مبین این بود که کشش سطحی محیط کشت به طور جزئی کاهش یافت اما مقدار کاهش قابل ملاحظه نبود (شکل۴-a). آبگریزی سلول‌های باکتریایی با اندازه‌گیری درصد سلول‌های انتقال بافته از فاز محیط کشت به فاز آلی هگزان و بنزن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های سویه Q-SH1 دارای خاصیت آب گریزی بالایی در محیط کشت دارای فنانترن بودند به طوری که حتی ۸۳ درصد سلول باکتری به فاز هیدروکربن انتقال یافتند و میزان آن در طول زمان آزمایش متغییر بود (شکل۴-b). آبگریزی سطح سلول فاکتور مهمی است که بر روی جذب و چسبندگی میکروب به سوبستراهای هیدروکربنی موثر می‌باشد (Whyte *et al*.,1998) . Gesheva و همکاران (2010) نیز آبگریزی بالای سطح سلول را به عنوان فرایند غالب در تجزیه فنانترن و رشد باکتری *Rhodococcus fascians* بیان کردند. سایر محققین نیز گزارش کردند که سورفکتانت‌های زیستی می‌توانند نقش مهمی در تغییر خاصیت آبگریزی سلول ایفا کنند. در نتیجه باعث افزایش تمایل سلول‌های میکروب به سمت سوبسترا می‌شوند و نهایتا زیست فراهمی سوبسترا را افزایش می‌دهند (Rosenberg and Rosenberg 1985).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴- a : درصد آبگریزی سلول در محیط شور حاوی فنانترن نسبت به زمان. b: تغییرات کشش سطحی محیط کشت بدون سلول

سورفکتانت‌های زیستی شامل طیف وسیعی از ترکیبات فعال سطحی مانند گلیکولیپید، لیپوپپتید، کمپلکس پلی ساکارید - پروتئین، فسفولیپید، اسیدهای چرب و چربی‌های خنثی هستند (Bodour and Maier, 2002). سورفکتانت های زیستی یا ترکیبات برون سلولی هستند یا بر روی سطوح سلول قرار دارند. برای مورد دوم خود سلول‌های میکروب سورفکتانت زیستی هستند و به هیدروکربن می‌چسبند. در این مسیرها سورفکتانت زیستی قادراست زیست فراهمی هیدروکربن های آرماتیک چندحلقه‌ای مانند فنانترن که انحلال پذیری پایینی دارند را افزایش دهد (Gilewicz *et al*., 1997; Olivera *et al*., 2003). با توجه به آبگریزی بالای سطح سلول‌های باکتری، تماس مستقیم سلول با آلاینده هیدروکربنی می‌تواند به عنوان فرآیند غالب در تجزیه فنانترن بر روی محیط دارای فنانترن - باشد.

نتیجه گیری نهایی

مطالعات سه دهه اخیر نشان می‌دهد که طیف گسترده ای از میکروب‌ها در شرایط محیطی سخت مانند دما و شوری بالا زندگی می‌کنند. این میکروب‌ها نه تنها قادرند چنین شرایطی را تحمل کنند بلکه برای رشد و زنده ماندن به این چنین شرایطی نیاز دارند. میکروب‌های که در چنین شرایطی رشد کرده اند دارای توانایی منحصر به فرد هستند که با استخراج، شناسایی و بررسی توانایی‌های آنها می‌توان در فناوری‌های زیستی نوین جهت رفع آلودگی‌های زیست محیطی مورد استفاده قرار گیرند. محققین متعددی بر موثر بودن استفاده از باکتری‌های شوردوست و تحمل کننده گرما که دارای توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها هستند در اصلاح محیط‌های آلوده به نفت خام بخصوص در جاهایی که شوری و دما بالاست تاکید کرده اند (Leon and Kumar 2005; Borgne and Quintero 2003).

جداسازی سویه Q-SH1 از خاک شور و سدیمی آلوده به پسماند نفتی نشان داد که باکتری‌های بومی محیط‌های سخت و آلوده به دلیل آداپته شدن با چنین شرایطی در طی زمان ممکن است دارای توانایی‌های ویژه‌ای در تجزیه آلاینده‌ها و تحمل شرایط سخت باشند. مقایسه نتایج این تحقیق با یافته‌های سایر محققین نشان می‌دهد که سویه Q-SH1 باکتریایی قادر به تجزیه فنانترن در طیف وسیعی از دما، شوری و غلظت فنانترن می‌باشد با توجه به این توانایی ممکن است که سویه Q-SH1 شوردوست و تحمل کننده دما برای اصلاح اکوسیستم‌های آلوده به نفت خام در محدوده وسیعی از شوری و دما مفید باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور در قالب طرح شماره ۸۹۰۰۳۹۳۲ انجام گردیده که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌نماید.

REFERENCES

Aizenshtat, Z., Miloslavski, I., Aschengrau, D, and Oren, A. (1999). Hypersaline depositional environments and their relation to oil generation. pp. 89-108 In: Oren, A. (ed.), *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments. CRC Press, Boca Raton.*

Al-Mailem, D. M., Sorkhoh, N. A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M. and 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

Arulazhagan, P. and Vasudevan, N. (2011). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. *Marine Pollution Bulletin,* 62, 388–394

Bodour, A. A. and Maier, R. M. (2002). Biosurfactants:

Archive of SID
www.SID.ir

types, screening methods, and applications. In: Bitton G (ed) Encyclopedia of environmental microbiology, 1st edn. Wiley, Hoboken, New Jersey, pp 750–770

Boldrin, B., Tiehm, A. and Fritzsche, C.(1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp., *Applied Environmental Microbiology,* 59, 1927-1930.

Borgne, S. L. and Quintero, R. (2003). Biotechnological processes for refining of petroleum. *Fuel Process Technology,* 81,155–169

Diaz, M. P., Boyd, K. G., Grigson, S. J. and Burgess, J. G. (2002). Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering,* 79,145–153.

Gesheva, V., Stackebrandt, E. and Vasileva-Tonkova, E.(2010). Biosurfactant Production by Halotolerant *Rhodococcus fascians. Current Microbiology,* 61,112–117

Gilewicz, M., Ni'matuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, H., Doumenq, P., Michotey, V. and Bertrand, J. C. (1997). Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnol*ogy 48, 528- 533.

Hart, D. J. and Vreeland, R. H. (1988). Change in the hydrophobic- htdrophilic cell surface character of Hlomonas elongate in response to NaCl . *Journal of Bacteriology,* 170,132-135

Kapley, A., Purohit, H.J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabarti, T. and Khanna, P. (1999). Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. *Bioresource Technology,* 67, 241–245.

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

Kiyohara. H., Nagao. K. and Yana. K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied Environmental Microbiology,* 43,454–457.

Koser, S.A (1923. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *Journal of Bacteriology*. 8, 493- 520.

Kumar, M., León, V., Materano, A. D. S. and Ilzins, O. A. (2007). A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp. Degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World Journal of Microbiology Biotechnology,* 23,211–220.

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 Microbiology and Biotechnol*ogy, 24,1047–1057.

Leon, V. and Kumar, M. (2005). Biological upgrading of heavy crude oil. *Biotechnology and Bioprocess Eng*ineering, 10, 471–481

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. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_123

Mille, G., Almallah, M., Bianchi, M., Van Wambeke, F. and Bertrand, J. C. (1991). Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry,* 339, 788–791

Nishloka, M., Chang, H. C. and Lee, M. L. (1986). Structural characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon isomers in coal tars and combustion products. *Environmental Science and Technology*, 20,1023-1027.

Olivera, N. L., Commendatore, M. G., Delgado, O. and Esteves, J. L. (2003). Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora *Journal of Industrial microbiology and Biotechnol*ogy, 30, 542-548.

Pospiech *A.,* Neumann *B. 1995.* A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet. 1995. 11: 217–218.*

Riis, V., Kleinsteuber, S. and Babel, W. (2003). Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Canadian Journal of Microbiology,* 49,713-721.

Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letter, 9, 29-33*

Sepic, E., Bricelj, M. and Leskovsek, H. (1998). Degradation of fluoranthene by *Pasteurella* sp. IFA and *Mycobacterium* sp. PYR-1: Isolation and identification of metabolites. *Journal of Applied Microbiology,* 85,746–754.

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

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

Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, *Applied Environmental Microbiol*ogy, 60, 258-263.

Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology Molecular Biology Reviews,* 62,504–544

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.

Archive of SID

www.SID.ir

Whitehouse, B. G. (1984). The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry,* 14,319–332

Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnierre, L., Innis, W. E. and Greer, C. W. (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychotropic *Rhodococcus* sp. *Applied Environmental Microbiology,* 64,2578–2584

Wong J.W.C., Lai K.M., Wan C.K., Ma K.K. and Fang M. (1999). isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation. *Water, Air, and Soil Pollution,* 139, 1–13

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

Archive of SID

www.SID.ir