Archive of SID

مجموعه مقالات چهارمین کنفرانس ملی مهندسی مخازن هیدروکربوری و صنایع بالادستی
۷ خرداد ۱۳۹۴، ایران، تهران، مرکز همایش‌های صدا و سیما
مجری: هم اندیشان انرژی کیمیا ۸۸۶۷۱۶۷۶ – ۰۲۱
www.Reservoir.ir

جداسازی یک کنسرسیوم باکتریایی از پساب پتروشیمی اراک برای اصلاح زیستی خاک های آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs)

زهرا فتحی[۱] , غلامحسین ابراهیمی‌پور[۲]

چکیده

آلودگی های مواد نفتی، پتانسیل بالفعل خاک ها برای استفاده های بهینه در زمینه ی کشاورزی و تولید محصول را شدیدا کاهش میدهند. هیدروکربن چند حلقه ای آروماتیک ، آلاینده های نفتی رایج با خاصیت سمی، ژنوتوکسیک، جهش زایی و سرطان زایی می باشند. بنابراین رها شدن آنها در خاک باعث از بین رفتن پوشش و تنوع گیاهی و جانوری و میکروبی خاک می شود و نیز باعث افت خصوصیات فیزیکی خاک (گسیختگی خاکدانه ها، کاهش خلل و فرج و افزایش وزن مخصوص ظاهری خاک) می شود. گسترش آن به آبهای زیرزمینی که برای مصارف انسانی استفاده می شوند باعث اثرات سوء برای انسان می شود. بنابراین باید روش هایی برای حذف این آلاینده ها استفاده شود. زیست پالایی یکی از روشهای برطرف سازی این آلاینده ها است که بسیار کم هزینه و بدون آسیب های محیطی و متکی بر میکروارگانیسمهای بومی و غیربومی می باشد. با توجه به نقش مثبت باکتریهای جنس سودوموناس در زیست پالایی، در این مطالعه توانایی دو گونه باکتری بومی بنام سودوموناس آئروژینوزا و اسفینگوموناس یانوکویا برای تجزیه ی آنتراسن و فلورن و فنانترن(به عنوان هیدروکربن های آروماتیک سه حلقه ای)و پیرن(هیدروکربن آروماتیک چهار حلقه ای) که جزء هیدروکربن های پلی آروماتیک نفتی هستند استفاده شد. سنتیک رشد مخلوط باکتر یایی در mg/L ۳۰۰ آنتراسن و فلورن ، mg/L ۲۰۰ فنانترن و mg/L۱۵۰پیرن (به عنوان تنها منبع کربن) در محیط پایه معدنی با روش پروتئین سنجی و تعیین میزان زیست پالایی با دستگاه گاز کروماتوگرافی طی ۱۰ روز متوالی در فواصل ۴۸ ساعته ارزیابی شد. نتایج نشان داد این مخلوط باکتریایی رشد خوبی در آنتراسن و فلورن داشته و طی ۱۰ روز بیش از ۹۹٪ فلورن، ۹۷٪ آنتراسن، ۹۵٪ فنانترن و ۶۰٪ پیرن را تجزیه کرده و استعداد خوبی برای استفاده برای اصلاح زیستی مناطق آلوده استفاده نمود.

کلمات کلیدی: هیدروکربنهای چندحلقه ای آروماتیک، اصلاح زیستی، کومتابولیسم، پروتئین سنجی، گاز کروماتوگرافی

www.SID.ir

Archive of SID

۱-مقدمه

هیدروکربنهای چند حلق های آروماتیک ترکیباتی کارسینوژن و موتاژن به شمار میروند که به طور گسترد ه ای در نتیجه فعالیتهای انسانی شامل کمپوست کردن سوختهای فسیلی و مواد آلی، سوختن زغال سنگ و مراحل تبخیری، اگزوز اتومبیلها، سوزاندن جنگلها، رسوخ نفت در محیط وارد شده اند.[۲و۱] یکی از راههای معمول ورود هیدروکربنهای چند حلقه ای آروماتیک به بدن به واسطه تنفس هوای آلوده و از طرف دیگر استفاده از آب یا غذای آلوده به هیدروکربنهای چند حلق های آروماتیک می باشد. مطالعات کلنیکی نشان میدهد که غلظت بالای یک ترکیب هیدروکربنهای چند حلقه ای آروماتیک می تواند باعث سرطانهای مختلفی در پوست، شش، معده و کبد شود.[۴و۳]

فنانترن یک هیدروکربن نامتقارن حاوی سه حلقه آروماتیک به هم اتصال یافته است و یکی از۱۲۹ آلوده کننده برتر معرفی شده به وسیله آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا است و یک ترکیب جهش زا با خاصیت سرطان زایی است. اگر چه فنانترن در شرایط طبیعی به وسیله جمعیت میکروبی بومی تجزیه می شوند ولی این پروسه ها معمولاً زمان بر و کند می باشد (۴). در نتیجه نیاز به توسعه تکنیک های پاک سازی ساده و با صرفه برای خاک هایی که با هیدروکربنهای چند حلق های آروماتیک آلوده شده اند امری بدیهی است.

متجاوز از ۲۰ سال گذشته تجزیه زیستی ترویج پیدا کرد و به عنوان یک استراتژی اقتصادی برای پا کسازی خاکهای آلوده به هیدروکربنهای چند حلق های آروماتیک با استفاده از باکتر یهای تجزیه کننده، مورد استفاده قرار گرفت. پا کسازی زیستی نه فقط در تجزیه آلودگیها میتواند مؤثر واقع شود بلکه میتوان از آن برای پا کسازی مواد ناخواسته از هوا، خاک، آب، ماده خام از مواد زاید صنعتی استفاده کرد.[۵ و۱]

توانایی باکتر یها در خاک، آب یا رسوبات برای تجزیه زیستی هیدروکربنهای چند حلقه ای آروماتیک به پیچیدگی ساختمان شیمیایی و مقدار سازگاری آنزیمی به وسیله باکتر یهای بومی در واکنش به فشار شدید به هیدروکربن های حلقوی است. باکتر یهای متعددی جداسازی شده اند که توانایی استفاده از هیدروکربنهای چند حلقه ای آروماتیک با وزن مولکولی پایین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارند اما هیدروکربنهای چند حلقه ای آروماتیک های محتوی تعداد حلقه آروماتیک بالاتر ، بسیار سرسخت هستند.[۶]

تجزیه به وسیله باکتری ها معمولاً از طریق اکسیداسیون اولیه آغاز می شود. در محیط های آلوده، میکروارگانیسم های موجود در جمعیت هایی با پیچیدگی و تنوع متابولیسم ترکیبات زیاد وجود دارند. عوامل پیچیده ای در درک رفتار باکتری در محیط مؤثر هستند. به همین دلیل معمولاً کمتر از یک درصد از میکروارگانیسم ها توانایی رشد در محیط های آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را دارند.[۷] هدف از این پژوهش، بررسی امکان رشد باکتر ی های بومی جداسازی شده از خاک آلوده به نفت در حضور فنانترن در آزمایشگاه و نیز شناسایی آن ها با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز و بررسی توانایی آنها در حذف غلظت های مختلف فنانترن است.

www.SID.ir

Archive of SID

۲- مواد و روشها

نمونه برداری: نمونه برداری از پساب پتروشیمی اراک انجام گردید و نمونه های جمع آوری شده طی ۲۴ ساعت بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.[۸]

محیط و شرایط کشت:

از محیط کشت پایه ی معدنی (۱g (NH4)2SO4 ، ۵ g KH2PO4 ، ۰,۱ g MgSO4.7H2O ، mg 5Fe(NH4)2(SO4)2 و ۱ml محلول عناصر کمینه) دارای آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن جهت غنی سازی و جداسازی باکتری هایی که قادر به رشد در این هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان تنها منبع کربن و انرژی هستند استفاده شد. در ابتدا با هدف انجام غنی سازی ml ۹۰ از محیط کشت پایه ی باکتریایی درون فلاسک های ml ۲۵۰ ریخته (۳تکرار) و سپس حدود ml ۱۰ پساب، به هر فلاسک اضافه و فلاسک ها با ۳۰۰mg/L آنتراسن و فلورن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی تکمیل شد. ارلن ها در شرایط تاریکی و در دمای ۳۵°c به مدت ۱۰ روز شیک شدند. برای غنی سازی بیشتر طی فرآیند انتقال ml ۱ از محیط کشت قبلی به محیط کشت تازه و اضافه کردن مجدد ماده تلقیحی آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن برای حداقل ۴ بار و با فواصل ۱۰ روزه انجام گردید.

جداسازی و شناسایی باکتریهای تجزیه کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

از محیط پایه معدنی + آگار (gr ۱۵ آگار+ یک لیتر محیط پایه معدنی) تهیه شد و پس از بسته شدن محیط در پلیت ها، به منظور ایجاد محیطی همگن، محلول ۱٪ فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن در استون در سطح آن اسپری شد و برای جداسازی باکتری ها به عنوان محیط جامد اختصاصی استفاده شد. سپس با استفاده از تکنیک اسپری کردن باکتر ی ها روی محیط کشت تلقیح شد. پلیت ها به مدت ۵- ۲ روز در ۳۵°c انکوبه شدند و کلنی های باکتریایی با ایجاد هاله ی شفاف در اطرافشان که نشان دهنده ی تجزیه شدن آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن است، مشاهده گردید و از بین آنها ۲ سویه که بهترین رشد را در محیط جامد داشتند انتخاب شد و برای خالص سازی بهتر و انجام تست های شناسایی به محیط نوترینت آگار منتقل شدند. سویه های باکتریایی جدا شده به وسیله تنوعی از واکنشهای بیوشیمیایی شناسایی شدند و در نهایت شناسایی با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز تکمیل شد.[۹]

ارزیابی رشد مخلوط باکتریایی با هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

به منظور تعیین میزان رشد مخلوط باکتریایی در آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن (تنها منبع کربن و انرژی)، از رسم منحنی پروتئین سنجی (روش پروتئین سنجی براد فورد) در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای این کار از محلول تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

شده برای هر ۲ باکتری با کدورت اولیه ی ۱ در طول موج۶۰۰ نانومتر به میزان ۱ml به ۱۰۰ml محیط پایه معدنی دارای ۳۰۰ mg/L فلورن و آنتراسن ، ۲۰۰mg/L فنانترن و ۱۵۰mg/Lپیرن تلقیح و به مدت ۱۰ روز در دمای $35^{o}c$ در شرایط تاریکی انکوبه شد. میزان رشد باکتریها طی این مدت با فواصل ۴۸ ساعته با استفاده از پروتئین سنجی اندازه گیری و تعیین شد و سپس منحنی رشد این مخلوط ترسیم گردید.[۶]

ارزیابی توانایی تجزیه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای توسط مخلوط باکتریایی:

میزان تجزیه ی در فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن توسط مخلوط باکتریایی با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی اندازه گیری شد.در این روش فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن باقی مانده در محیط های کشت انکوبه شده بعد از ۱۰ روز با استفاده از اتیل استات(به عنوان حلال غیر قطبی) استخراج شد.برای استخراج ۱۰۰ml اتیل استات به کل محیط افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه شیک گردید. سپس با استفاده از دکانتور فاز آلی جدا شده و نمونه برای اندازه گیری آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن باقیمانده به دستگاه GC-FID تزریق شد.[۱۰]

۳-نتایج و بحث:

جداسازی و شناسایی باکتر یهای تجزیه کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

گونه های مختلف باکتریایی از نمونه ی پساب جدا شد اما ۲ سویه که توانایی بالایی در حذف فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن ، زمانی که به صورت مخلوط باهم کشت داده شدند، از بین آنها انتخاب شدند مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج تست های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان داد که این ۲ سویه ی جدا شده ۹۹٪ شباهت را به سودوموناس آئروژینوزا و اسفینگوموناس یانوکویا دارند.

ارزیابی رشد مخلوط باکتریایی:

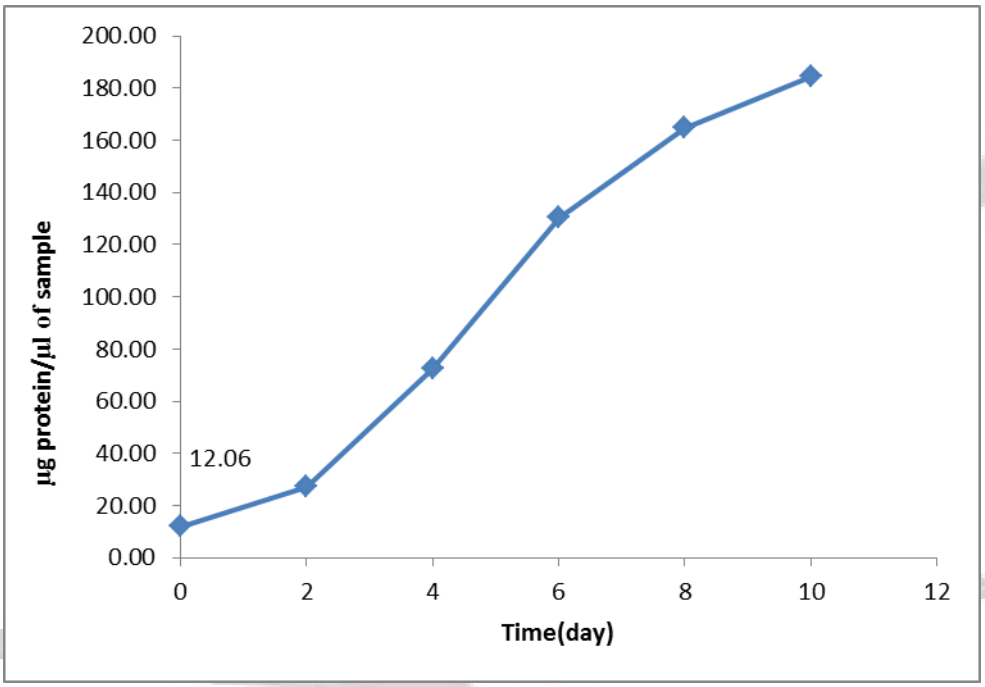
کلنی های آنها طی ۵ -۳ روز بر روی محیط پایه معدنی + فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن +آگار با تشکیل هاله ی شفاف در اطراف کلنی ظاهر گردید که این هاله ی شفاف بیانگر تجزیه شدن آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن از اطراف کلنی باکتری ها طی رشد است.نتایج پروتئین سنجی نشان داد این مخلوط رشد خوبی را در محیط پایه معدنی + آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن دارد.

نمودار رشد مخلوط باکتر یایی طی۱۰ روز نشان داد که هر ۲ باکتری جدا شده بهترین رشد در فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن را زمانی داشتند که باهم به صورت میکس کشت داده شدند در حالی که به تنهایی رشد خوبی را نشان ندادند. احتمالا تولید حد واسط هایی که حالت سمی برای باکتری دارد دلیل این فرایند است. باکتری ها زمانی که به صورت میکس کشت داده میشوند با فعالیت کومتابولیسمی این مواد را تقلیل میدهند. باکتری های جدا شده در این مطالعه توانایی تحمل غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

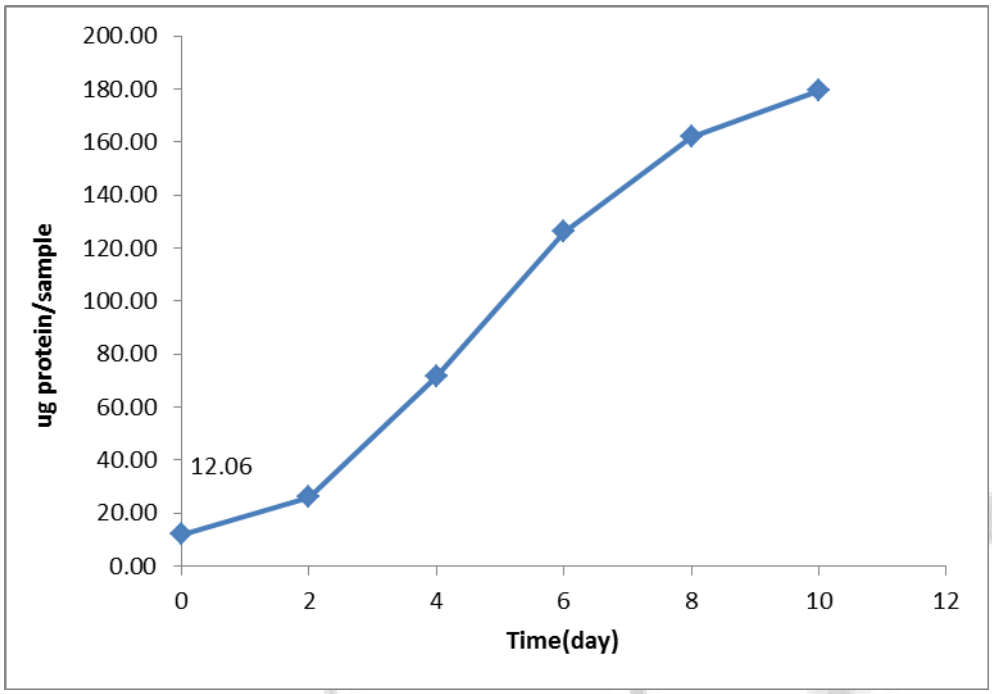
های بالای فلورن، آنتراسن، فنانترن و پیرن را نیز داشتند. نتایج حاصل از پروتئین سنجی نشان میدهد که کشت مخلوط در ۲۴ ساعت اول پس از تلقیح، سرعت رشد تقریباً پایینی داشته و در روزهای ۲تا ۸ سرعت رشد افزایش می یابد.اما در روزهای آخر دوباره سرعت کاهش می یابد که دلیل آن میتواند کاهش منبع کربن و انرژی و افزایش مواد زاید باشد. (شکل ۱)



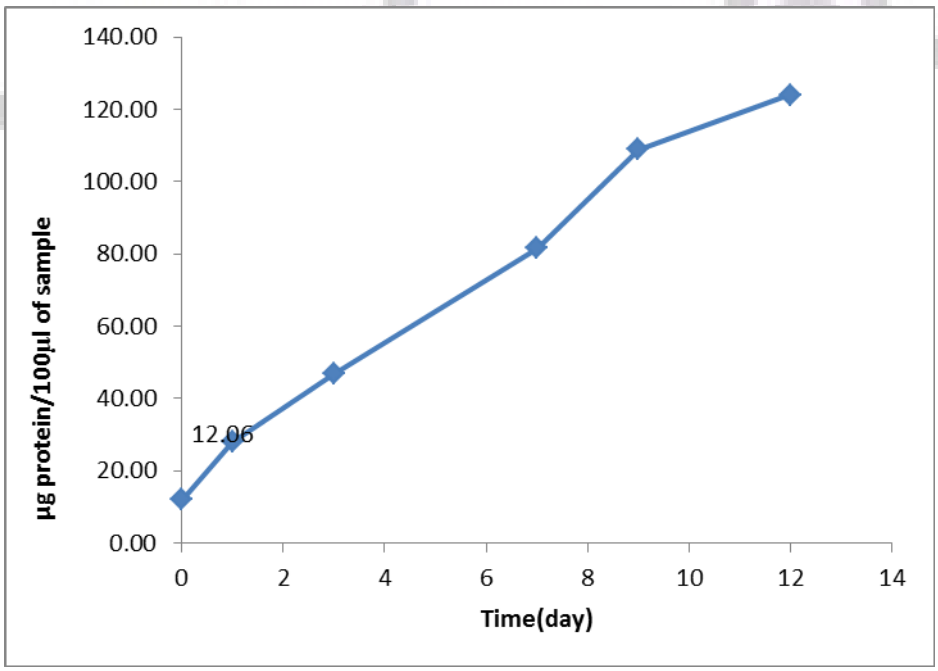
الف) فلورن

www.SID.ir

Archive of SID



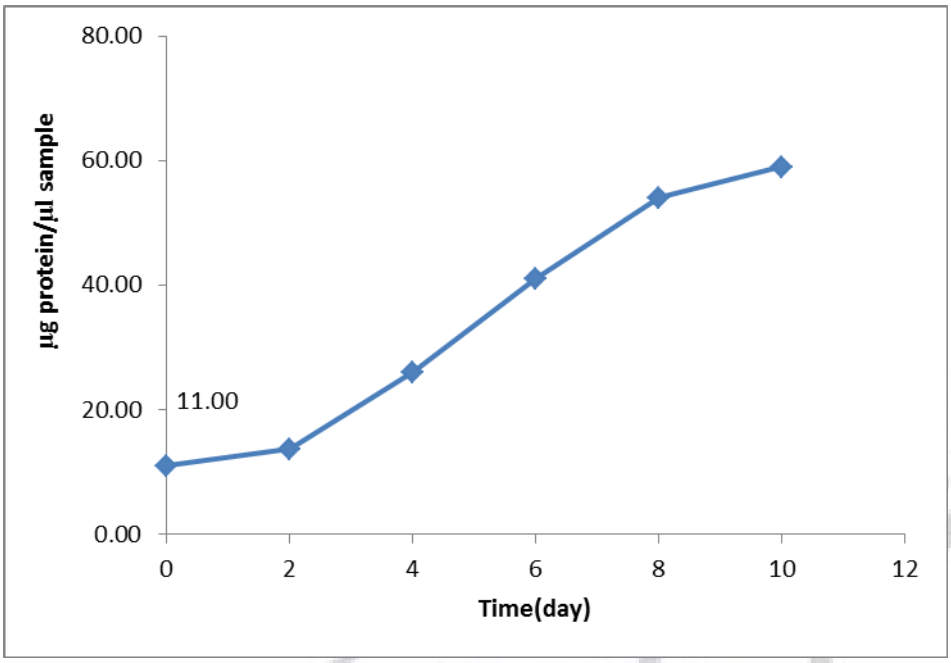
ب) آنتراسن



ج) فنانترن

www.SID.ir

Archive of SID



د) پیرن

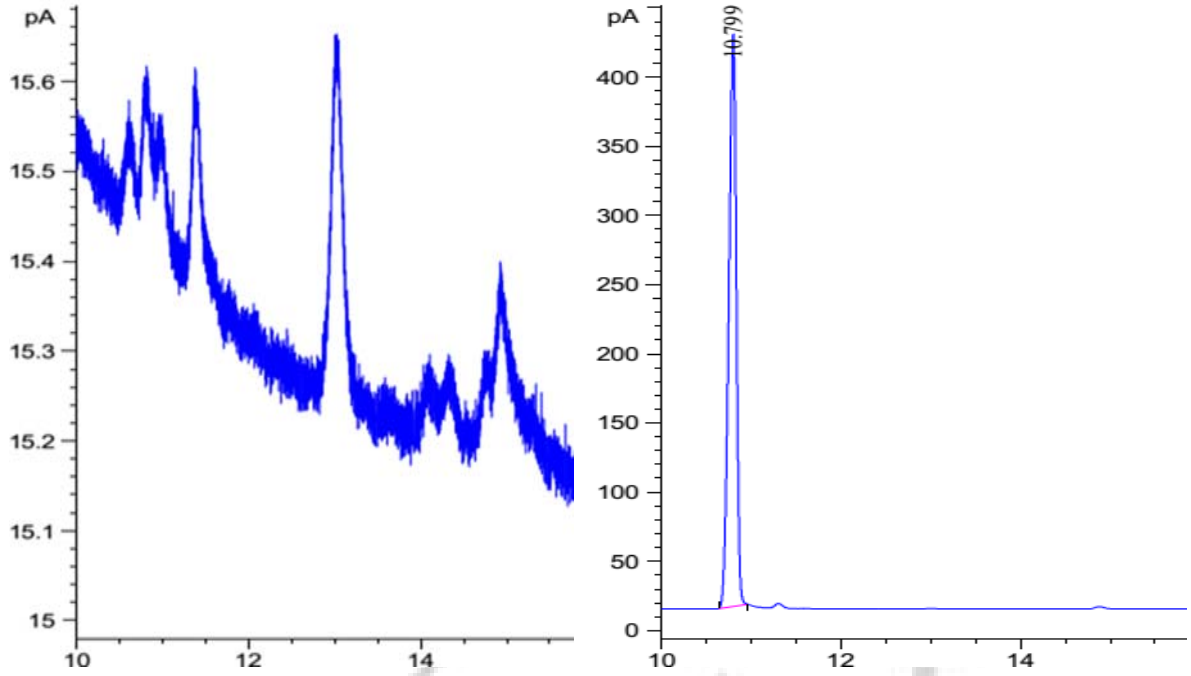
شکل ۱ :نمودار رشد مخلوط باکتریایی در محیط پایه معدنی دارای هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان منبع کربن و انرژی

آنالیز های تجزیه ی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای:

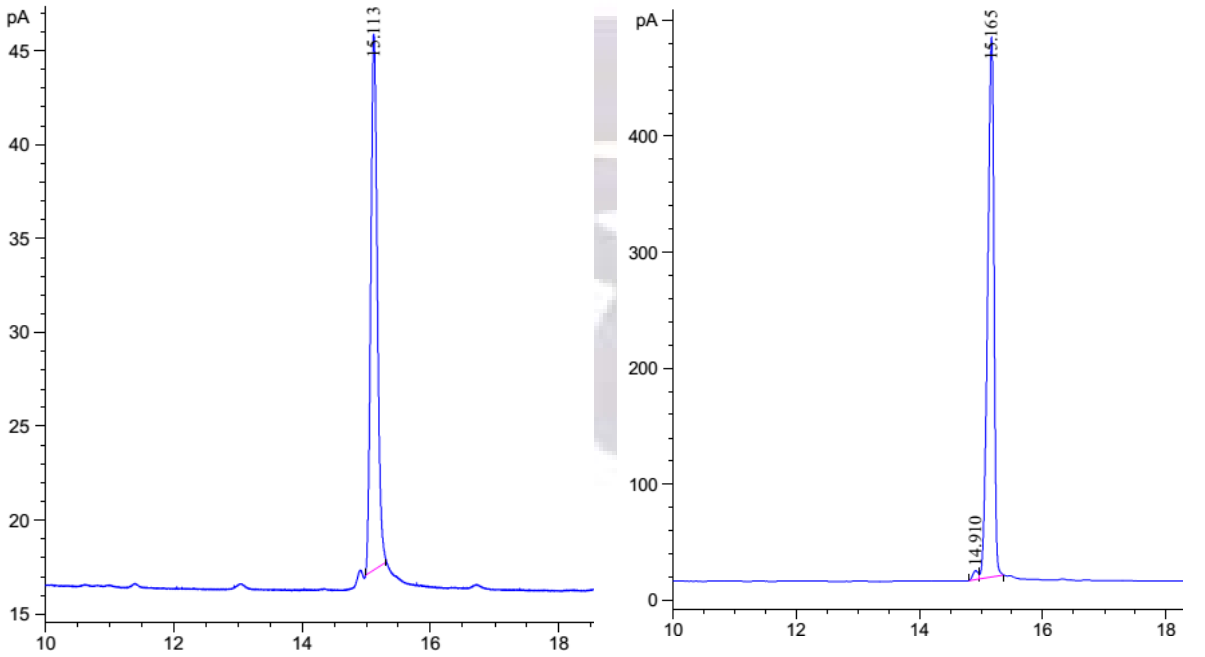
نتایج حاصل از گاز کروماتوگرافی نشان داد که این ۲ سویه ی باکتری زمانی که به صورت مخلوط در محیط پایه معدنی حاوی۳۰۰mg/L فلورن و آنتراسن، ۲۰۰mg/L فنانترن و ۱۵۰mg/Lپیرن کشت داده میشوند در مدت زمان ۱۰ روز میتوانند بیش از ۹۹٪ فلورن، ۹۷٪ آنتراسن، ۹۵٪ فنانترن و ۶۰٪ پیرن را تجزیه کنند. (شکل ۲) با افزایش غلظت هیدروکربن ها این میزان کاهش می یابد و با افزایش زمان انکوباسیون میزان تجزیه افزایش می یابد. همچنین با افزایش تعداد حلقه های آروماتیک، ترکیب نسبت به تجزیه مقاوم تر شده و زمان بیشتری را برای تجزیه شدن نیاز دارد. این ۲ باکتری زمانی که به صورت تکی کشت داده شدند قادر بودند فقط کمتر از ۲۰٪از آنتراسن و فلورن وکمتر از ۱۵٪ از فنانترن و۱۰٪ از پیرن را تجزیه کنند. اما زمانی که به صورت مخلوط کشت داده شدند میزان تجزیه به طور قابل توجهی افزایش یافت که دلیل این پدیده روابط کومتابولیسمی موجود بین این ۲ باکتری میتواند باشد.میزان تجزیه با محاسبه ی مساحت زیر نمودار پیک حاصل از گاز کروماتوگرافی نشان داد که مخلوط باکتری در غلظت ۳۰۰mg/L آنتراسن، فلورن، ۲۰۰mg/L فنانترن و ۱۵۰mg/Lپیرن کشت داده میشوند در مدت زمان ۱۰ روز میتوانند بیش از ۹۹٪ فلورن، ۹۷٪ آنتراسن، ۹۵٪ فنانترن و ۶۰٪ پیرن را تجزیه کنند. میزان تجزیه با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می یابد.

www.SID.ir

Archive of SID



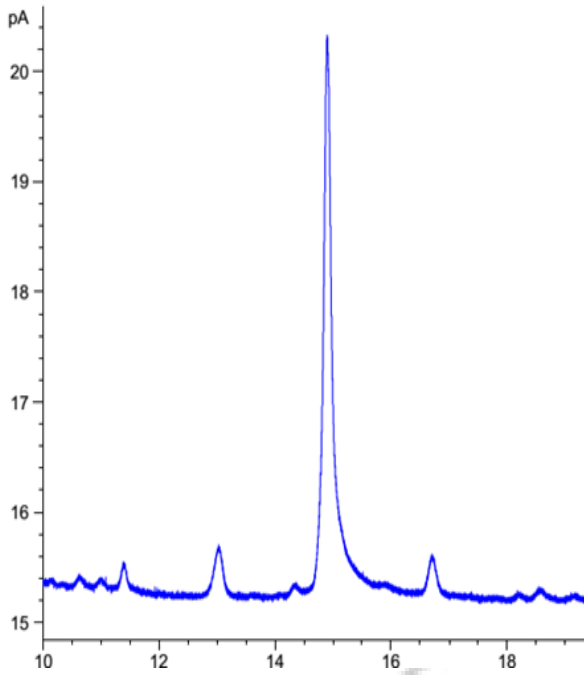
الف) نمونه ی فاقد باکتری با فلورن (شاهد) نمونه ی دارای مخلوط باکتری با فلورن



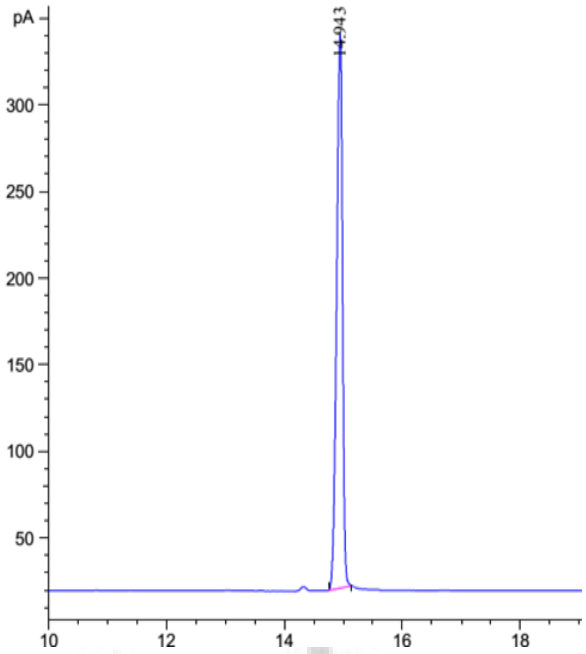
ب) نمونه ی فاقد باکتری آنتراسین (شاهد) نمونه ی دارای مخلوط باکتری آنتراسن

www.SID.ir

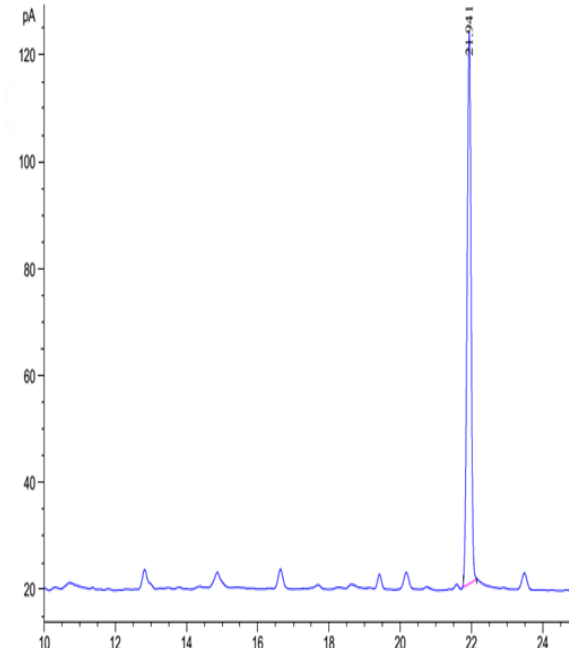
Archive of SID



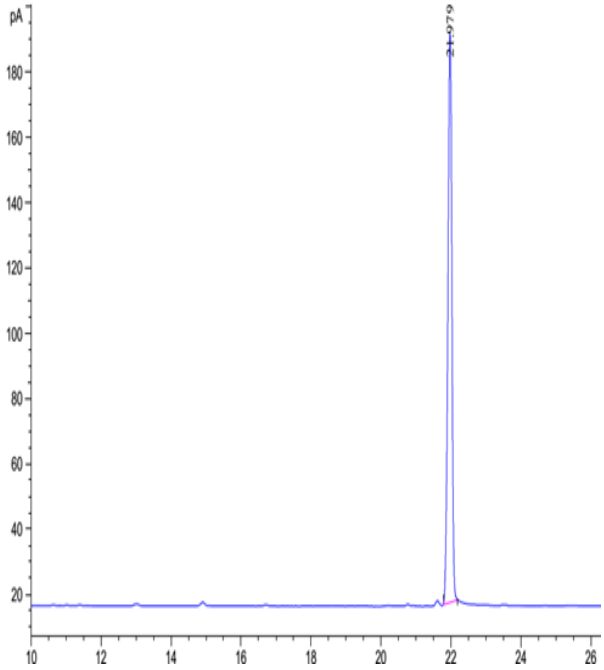
نمونه ی دارای مخلوط باکتری با فنانترن



ج) نمونه ی فاقد باکتری با فنانترن(شاهد)



نمونه ی دارای مخلوط باکتری با پیرن



د) نمونه ی فاقد باکتری با پیرن(شاهد)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲: کروماتوگرام های حاصل بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در محیط پایه معدنی حاوی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای

نتیجه گیری:

با توجه به خطرات ناشی از ورود هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای- به ویژه در نتیجه ی پساب پتروشیمی که مهمترین منبع این ترکیبات آلی است- در محیط زیست برای حیات موجودات زنده به خصوص انسان، حذف یا تقلیل این ترکیبات از محیط به اندازه ی قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی بسیار حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه با جداسازی و شناسایی گونه های باکتریایی که توانایی بالایی در رشد و تکثیر در محیط های آلوده به هیدروکربن های چند حلقه ای آروماتیک را داشتند مشخص گردید که حذف این ترکیبات از محل های آلوده د با استفاده از باکتری های بومی جداسازی شده از همان خاک بهتر صورت می پذیرد. همچنین در بررسی های آینده پیشنهاد می گردد که مراحل حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای دیگر با حلقه های بنزنی بیشتر علاوه بر آنتراسن، فلورن، فنانترن و پیرن توسط مخلوط باکتریی مذکور مورد بررسی قرار گیرد و نیز از این مخلوط باکتریایی در ابعاد وسیعتر برای بررسی توانایی آن در حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای برای اصلاح محیط های آلوده به پساب پتروشیمی استفاده گردد.

مراجع

1. Lease CW., (2006), Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by defined bacterial and fungal cocultures. Flinders University, School of Biological Sciences;

2. John R, Essien J, Akpan S, Okpokwasili G., (2012), Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. Bull environ contam toxico.

3. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T., (2004), Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms.

4. Wick AF, Haus NW, Sukkariyah BF, Haering KC, Daniels WL., (2011), Remediation of PAH- contaminated soils and sediments: a literature review. Virginia Polytechnic Institute and State University.

5. Arun K, Ashok M, Rajesh S., (2011), Crude oil PAH constitution, degradation pathway and associated bioremediation microflora: an overview.

6. Seo J-S, Keum Y-S, Li QX., (2009), Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res Public Health.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Haritash AK, Kaushid CP., (2009), Biodegradation aspects of poly aromatic hydrocarbons (PAHs). Hazard Mater

8. DeSalle R, Giribet G, Wheeler W., (2002), Techniques in molecular systematics and evolution: Springer.

9. Madueño L, Coppotelli B, Alvarez H, Morelli I., (2011), Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina.

10. Shahriari Moghadam, M., Ebrahimipour, G., Abtahi, B., Ghassempour, B., (2014), Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments Journal of Environmental Health Science & Engineering.

www.SID.ir