بررسی توانایی باکتری‌های بومی خاک جزیره سیری در پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی

زهرا خمارباقی[۱]، محمد علی آموزگار[۱]، محمود شوندی*[۲]، محمد مهدی دستغیب[۲] و حسن تیرانداز[۲]

۱- پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، مرکز تحقیقات اکسترموفیل‌ها، دانشگاه تهران، ایران

۲- پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۲

چکیده

آلودگی‌های نفتی همواره به عنوان یک تهدید جدی برای محیط زیست محسوب می‌شوند. پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت به عنوان روشی ارزان و کارآمد از اهمیت فراوانی برخوردار است. هدف از پژوهش حاضر بررسی پاک‌سازی زیستی آلاینده‌های نفتی مختلف در نمونه خاک جزیره سیری جهت اثبات توانایی سویه‌های بومی، برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی موجود در این جزیره است. به منظور شبیه‌سازی محیط طبیعی، میکروکازم‌هایی از خاک غیر آلوده این جزیره تهیه شد و سپس به طور مصنوعی به مقادیر مشخصی از ترکیبات نفتی شامل ترکیب آلکان‌ها و پلی‌آروماتیک‌ها (PAH) آلوده شدند و پس از افزودن منبع نیتروژن و فسفات و آب، در یک دوره شش ماهه میزان آلاینده‌های باقی مانده و جمعیت باکتری‌های هتروتروف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که بعد از گذشت شش ماه در میکروکازم آلکان، $C_{۱۳}$ کمترین مقدار و $C_{۲۰}$ بیش‌ترین مقدار آلکان‌های باقیمانده در محیط را تشکیل می‌دهند و در میکروکازم حاوی PAH نیز میزان تجزیه مستقیما به تعداد حلقه آنها بستگی داشت به‌طوری‌که بعد از گذشت شش ماه مقدار تمامی PAH به غیر از بنزوآلفاپایرن تقریبا به صفر رسید؛ از طرفی منحنی جمعیت باکتری‌های هتروتروف با منحنی کاهش میزان آلاینده‌ها کاملا منطبق است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت میکرو ارگانیسم‌های بومی خاک جزیره سیری توانایی بالایی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارند بنابراین می‌توان با اندیشیدن تمهیداتی جهت تحریک رشد آنان شرایط را برای تجزیه هر چه موثرتر آلاینده‌های نفتی در این جزیره فراهم کرد.

کلمات کلیدی: پاک‌سازی زیستی، جزیره سیری، آلکان‌ها، ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، نفت خام، میکروکازم، تحریک زیستی، میکروفلور خاک

مقدمه

در دنیای صنعتی امروز نفت به عنوان مهمترین منبع فسیلی تامین‌کننده انرژی و نیز ماده خام صنایع پتروشیمی ارزش و اهمیت فزاینده‌ای پیدا کرده است، با این وجود همواره نفت خام به عنوان ترکیبی بسیار سمی، به عنوان یک خطر زیست-محیطی مورد توجه بوده است[۱]. در تمامی مراحل تولید، حمل و نقل، پالایش و استفاده

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی: shavandim@ripi.ir

محصولات نفتی، تماس این مواد با محیط زمینه‌های آلودگی را فراهم می‌سازد. اگرچه آلودگی محیط زیست به‌وسیله ترکیبات هیدروکربنی به صورت طبیعی نیز روی می‌دهد اما در سال‌های اخیر موارد نشت نفت خام ناشی از فعالیت بشر به شدت افزایش یافته است و آسیب‌های فراوانی به محیط زیست وارد کرده است [۲]. از این رو پاک‌سازی محیط‌های آلوده با روش‌هایی موثر و ارزان مثل روش پاک‌سازی زیستی از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد.

درحال حاضر تکنولوژی‌های زیادی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده وجود دارند. برخی از آنها عبارتند از: دفن ترکیب آلوده کننده، تثبیت و جامدسازی[1]، سوزاندن و ذوب الکتریکی خاک های آلوده[2] و غیره. اکثر این تکنولوژی‌ها هزینه‌بر هستند و در ضمن منجر به حذف کامل آلودگی هم نمی‌شوند. پاک‌سازی زیستی در مقایسه با این روش‌ها برای حذف دامنه وسیعی از ترکیبات آلوده کننده به خصوص هیدروکربن‌های نفتی نویدبخش‌تر است. در ضمن این روش از نظر زیست محیطی کاملا ایمن است و منجر به تجزیه کامل ترکیبات سمی و تبدیل آنها به ترکیبات بی‌ضرر می‌شود. هم چنین این روش نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی ارزان‌تر می‌باشد[۳].

دو مسیر کلی برای اجرای فرآیند پاک‌سازی زیستی وجود دارد:

– تحریک زیستی[3]: فعال‌سازی فلور میکروبی طبیعی خاک با استفاده از روش‌هایی مثل هوادهی[4] و یا افزودن مواد غذایی به خاک

– افزایش زیستی[5]: افزودن میکرو ارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن به محیط

تحریک زیستی به سبب هزینه کمتر و ایمنی زیستی بالاتر در روش‌های پاک‌سازی میدانی در دنیا رایج‌تر است [۴].

آزمایش‌های میکروکازم در بررسی پتانسیل میکروبی تجزیه آلودگی هیدروکربنی خاک و ایجاد مدل‌هایی برای پیش‌بینی سرنوشت آلوده کننده‌ها در خاک بسیار موثر هستند. در این مدل‌ها می‌توان معادلات ریاضی طراحی کرد که سینتیک تجزیه و تغییر ترکیب مورد بررسی را شرح دهند. علاوه بر این، آزمایش های میکروکازم در انتخاب بهترین استراتژی پاک‌سازی زیستی درمقیاس‌های وسیع موثر هستند [۵]. در میکروکازم‌ها علاوه بر سنجش سرعت تجزیه هیدروکربن‌ها، می‌توان سایر فاکتورهای موثر بر این فرآیند، مانند تعداد میکروب‌ها، pH، غلظت مواد غذایی و میزان رطوبت محیط را نیز اندازه‌گیری نمود [۵]. در مطالعه‌ای که توسط Rahman و همکاران انجام شد از روش میکروکازم برای بررسی اثر افزودن مواد مغذی (نیتروژن، فسفات و پتاسیم) و همچنین بیوسورفکتانت رامنولیپید در افزایش حذف آلاینده‌های نفتی استفاده شد و نشان داده شد که میزان افزودن مواد مغذی، زمان انکوباسیون و ترکیب مواد مغذی می‌تواند بر رشد باکتری‌ها، غلظت پروتئین‌ها و حذف آلاینده نفتی تاثیر عمده‌ای داشته باشد [۶]. در مطالعه‌ای دیگری که توسط ChaIneau و همکاران انجام شد از این روش برای بررسی حذف هیدروکربن‌های نفتی کنده‌های حفاری استفاده شد و نشان داده شد که در طی ۱۶ روز آلکان‌های اشباع و منشعب به طور کامل حذف شدند و پس از گذشت ۲۷۰ روز حدود ۷۵٪ از هیدروکربن‌های نفتی کل موجود در میکروکازم حذف گردیدند[۷].

برای اثبات کارآمدی تکنولوژی پاک‌سازی زیستی، باید اثر میکرو ارگانیسم‌ها در تجزیه هیدروکربن‌ها تحت شرایط مناسب و کنترل شده آزمایشگاهی امکان‌سنجی و بررسی شود. در بررسی‌ها مطالعه جمعیت‌های میکروبی بومی و همچنین نقش آنها در تجزیه آلاینده‌ها در محیط بسیار کلیدی است و به طراحی روش‌های هرچه مناسب‌تر

1. Stabilization/Solidification
2. Vitrification
3. Biostimulation
4. Aeration
5. Bioaugmentation

و موثرتر برای پاک‌سازی زیستی آلاینده‌ها در محیط واقعی کمک شایانی می‌کند. در این پژوهش از روش تهیه میکروکازم و شمارش تعداد باکتری‌ها در طی فرآیند پاک‌سازی، برای بررسی توانایی باکتری‌های بومی خاک جزیره سیری در حذف آلاینده‌های نفتی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از خاک جزیره سیری انجام شد و نمونه‌ها تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در شرایط محیطی نگهداری شدند. محل نمونه‌برداری در مجاورت جاده منتهی به کارخانه گاز سلمان، عرض جغرافیایی ۲۵/۹۰۹۸۳۱ و طول جغرافیایی ۵۴/۵۳۲۰۵، واقع شده است. به منظور یکنواخت شدن بافت خاک، نمونه‌ها پس از خرد کردن و یکنواخت سازی از صافی عبور داده شده و سنگریزه‌ها از خاک جدا شد.

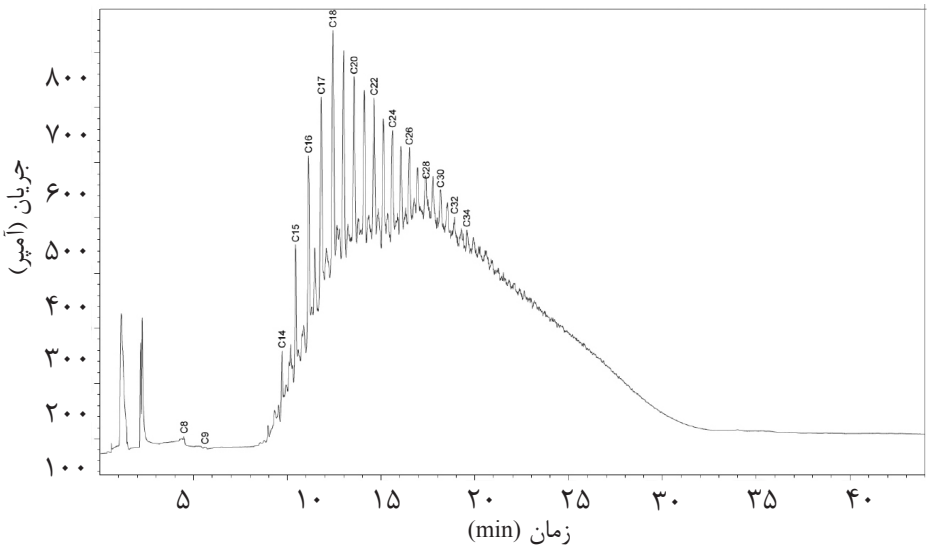
آنالیز فیزیکی و شیمیایی خاک جزیره سیری

برای تعیین بافت خاک، ابتدا خاک از الک ۲ mm عبور داده شد. سپس ۵۰ gr خاک با ۲۰ ml هگزامتافسفات سدیم مخلوط و ۳۰۰ml آب به مخلوط فوق اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط فوق به مزور یک لیتری منتقل و به حجم Lit ۱رسانیده شد. با کمک دستگاه هیدرومتر خاک، اندازه‌گیری اول s ۴۰ پس از انتقال مخلوط آب و خاک و به هم زدن آن و اندازه‌گیری دوم hr ۲ پس از اندازه‌گیری اول انجام گردید و بر اساس جداول استاندارد درصد اجزای خاک تعیین شد [۸]. برای سنجش مقدار ماده آلی کل موجود در نمونه خاک از دستگاه CHN آنالیزر عناصر[1] استفاده شد. سنجش نیتروژن و کربن کل موجود در نمونه خاک بر اساس روش استاندارد ASTM D5291 انجام پذیرفت. مقدار فسفر با دستگاه ICP [2] و مقدار پتاسیم با کمک دستگاه اسپکتروسکوپی جذب اتمی (AAS) [3] اندازه‌گیری شد [۸].

تهیه میکروکازم‌ها

میکروکازم آلکان (A)

با توجه به نتایج اولیه آنالیز Simulated Distillation (شکل ۱)، ترکیبات سبک‌تر از ۱۳ کربن در طول دو هفته تبخیر شده و از خاک خارج شده بودند، از طرفی بیشترین ترکیبات باقی مانده در خاک ترکیبات ۱۳ تا ۲۰ کربنی بودند.



شکل ۱- طیف اجزای تشکیل دهنده هیدروکربن استخراج شده از خاک تیمار شده با نفت خام حاصل از آنالیز Sim-Dis

1. Elemental Analyzer
2. Inductively Coupled Plasma
3. Atomic Absorption Spectroscopy

بنابراین آلکان‌های C_{13} تا C_{20} به منظور بررسی میزان تجزیه‌پذیری توسط میکرو ارگانیسم‌ها در خاک، به منظور تهیه میکروکازم آلکان انتخاب شدند و به میزان ۱٪ وزنی مخلوطی از حجم مساوی آلکان‌های ۱۳ تا ۲۰ کربنه به خاک اضافه گردید.

میکروکازم ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای (P)

ترکیبات فنانترن، آنتراسن، فلورانتن، پایرن (هر یک به میزان ۱۰۰ ppm) و آلفابنزوپیرن (۲۰ ppm) به عنوان ترکیبات پلی-آروماتیک (PAH) مدل انتخاب و به منظور بررسی میزان تجزیه‌پذیری توسط میکروارگانیسم‌ها در خاک، به نمونه خاک اضافه شدند.

میکروکازم مخلوط آلکان و آروماتیک (PA)

به منظور بررسی روند تجزیه و وجود کومتابولیسم احتمالی در حضور هم‌زمان هر دو نوع ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک، این میکروکازم با مخلوطی از ترکیبات میکروکازم‌های آلکان و PAH و به میزان بیان شده در بالا تهیه شد.

گرمخانه‌گذاری[1] میکروکازم‌ها

برای گرمخانه‌گذاری میکروکازم‌ها، نمونه‌های خاک تهیه شده در ظرف‌های پلاستیکی درب‌دار ریخته شد. به منظور تأمین رطوبت مورد نیاز میکرو ارگانیسم‌ها ۲۰٪ وزن خاک آب دیونیزه استریل به ظرف‌ها افزوده شد، در ضمن به منظور تامین نیترات و فسفات مورد نیاز باکتری‌های خاک، نمک‌های نیترات آمونیوم و فسفات پتاسیم (با رعایت نسبت کربن: نیتروژن: فسفر به ترتیب یک، ده و صد) به هر یک از ظرف‌ها افزوده شد. میکروکازم‌ها برای یک بررسی ۶ ماهه در دمای اتاق قرار داده شدند. در طول این مدت جهت هوادهی به صورت هفتگی خاک داخل ظروف هم‌زده شد و رطوبت میکروکازم‌ها با افزودن آب دیونیزه استریل ثابت نگه داشته شد.

آنالیز شیمیایی میکروکازم‌ها

به منظور سنجش میزان مصرف هیدروکربن‌های نفتی توسط میکروارگانیسم‌های خاک، هر دو هفته یکبار از میکروکازم‌های آلوده شده نمونه برداری شد و برای تعیین میزان آلاینده باقی مانده در خاک برای هر آلاینده روش آنالیز مناسب به شرح زیر به کار برده شد.

آنالیز شیمیایی آلکان‌ها

از میکروکازم آلکان هردو هفته یکبار به مقدار ۱ gr نمونه‌برداری شد. هیدروکربن به جامانده در محیط پس از استخراج با کروماتوگرافی ستونی، در هگزان حل شد و سپس نوع و میزان آلکان‌ها با کروماتوگرافی گازی تعیین شد. جهت استخراج هیدروکربن‌ها از خاک، هم وزن نمونه خاک نمک سولفات سدیم بدون آب به ارلن مایر حاوی آن اضافه شد و به مدت ۱۵ min مدام هم‌زده شد. پس از آبگیری، حلال دی کلرومتان به قدری اضافه شد تا روی خاک را به خوبی پر کند و سپس ارلن مایر به مدت ۲۰ min در حمام سونیکاتور قرار داده شد. برای اطمینان از استخراج کامل هیدروکربن‌های باقیمانده مرحله استخراج حلالی سه مرتبه تکرارشد. ماده استخراج شده در حلال سیکلوهگزان حل شد و به منظور جدا کردن هیدروکربن های آلیفاتیک از هیدروکربن‌های آروماتیک به کروماتوگرافی ستونی محتوی سیلیکا ژل تزریق شد [۹].

یک میکرولیتر از نمونه تفکیک شده در ستون، در هگزان حل شده و به دستگاه کروماتوگرافی Chrompack مدل 438A مجهز به آشکارساز FID [2] و با ستون مویینه CP- sil5-CB 0.15;0.25;50 (به طول ۵۰ m، قطر ۰/۲۵ mm و ضخامت پوشش ۰/۱۵ ml) تزریق شد. برنامه دمایی از ۴۰°C آغاز شد و ۴ min ثابت نگه داشته شد، سپس با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۵۸°C رسید.

آنالیز شیمیایی ترکیبات PAH

ازمیکروکازم PAH هردو هفته یکبار به مقدار ۱ gr نمونه برداشته شد. هیدروکربن به جامانده

1. Incubation
2. Flame Ionization Detector

در محیط پس از استخراج با کروماتوگرافی ستونی، در هگزان حل شد و سپس نوع و میزان PAH های باقیمانده درخاک با آنالیز HPLC تعیین شد. دستگاه HPLC مجهز به پمپ دوتایی ۴۱۰، آشکارساز SFD[1]، حلقه تزریق 7725i Rheodyne به حجم ۲۰ µl و ستون PAH C18 (با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ mm و اندازه ذرات ۵ µm) بود. جدا سازی با سرعت جریان[2] ۱ cc/min در دقیقه انجام شد. سپس غلظت هر کدام از نمونه‌ها با محاسبه سطح زیر منحنی‌های موجود در کروماتوگرام محاسبه شد[۱۰].

شمارش جمعیت باکتریایی خاک

به منظور بررسی روند تغییر جمعیت میکروب‌های موجود در میکروکازم، تعداد باکتری‌های هتروتروف قابل کشت با روش[3] MPN سه لوله‌ای تعیین شد [۱۱]. در فواصل زمانی معین از هر میکروکازم ۱ gr خاک نمونه‌برداری شد و با ۹ cc محلول سرم فیزیولوژی استریل مخلوط شد و این روند تا تهیه رقت 10^{-9} تکرار شد. برای شمارش باکتری‌های هتروتروف از محیط مایع R_2A استفاده شد. پس از رقت سازی از خاک‌ها، از هر رقت به ۳ لوله آزمایش حاوی محیط کشت R_2A تلقیح گردید و پس از تلقیح در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری با مراجعه به جدول استاندارد تعداد باکتری‌های موجود در هر نمونه محاسبه و نمودار رشد باکتری‌های هتروتروف برای هر میکروکازم رسم شد.

آنالیز بافت خاک نشان داد که بافت خاک این جزیره عمدتا از نوع لوم رس لیمونی می‌باشد که حاوی ۱۱٪ شن، ۳۶٪ رس و ۵۳٪ سیلت است. بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه خاک جزیره سیری که در جدول نشان داده شده است، به طور کلی خاک جزیره سیری از نظر منابع نیترات و فسفات ضعیف است. بنابراین به منظور تحریک رشد میکرو ارگانیسم‌های این خاک، مواد غذایی با نسبت مناسب هنگام تهیه میکروکازم‌ها به خاک‌ها اضافه شد.

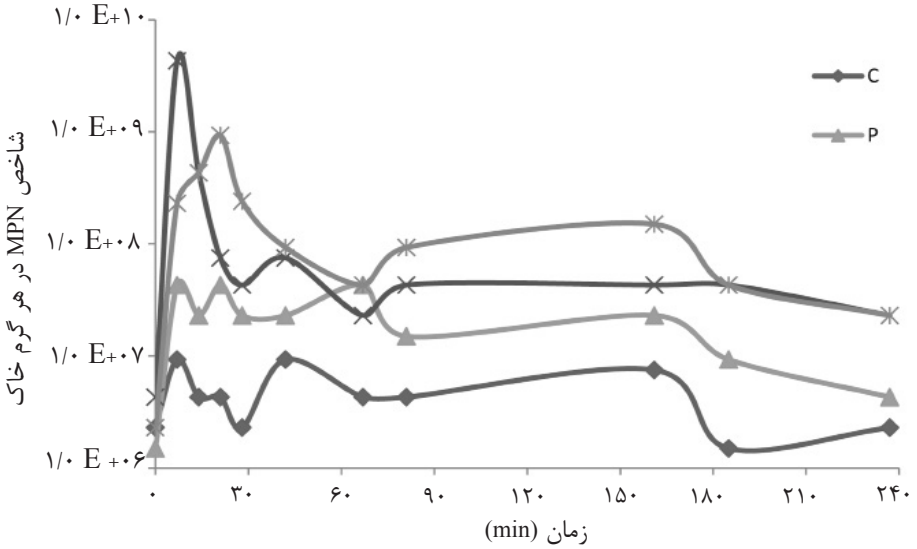
شمارش باکتری‌های هتروتروف

تعداد باکتری‌های هتروتروف قابل کشت که با روش MPN سه لوله‌ای در هر ۵ میکروکازم تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در هر چهار میکروکازم جمعیت باکتری های هتروتروف در همان هفته اول بلافاصله بعد از افزودن آب و منابع کربن و نیتروژن و فسفات افزایش یافته و بعد از این مدت جمعیت باکتری‌ها در اغلب میکروکازم‌ها تقریباً ثابت مانده و بعد از آن رو به کاهش گذاشته است. در ضمن جمعیت باکتری‌ها با نوع و مقدار آلودگی میکروکازم منطبق است به طوری که میکروکازم کنترل که فاقد آلودگی هیدروکربنی است کمترین جمعیت میکروبی را نشان می‌دهد (حدود 10^{7} عدد در هر گرم)، بعد از آن میکروکازم PAH که جمعیت بیشینه آن حدود 10^{8} عدد در هر گرم است و سپس میکروکازم PA با جمعیت بیشینه حدود 10^{9} و نهایتا میکروکازم A با جمعیت حدود 10^{10}، بیش‌ترین تعداد جمعیت باکتریایی را نشان می‌دهند.

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی نمونه خاک جزیره سیری

	فسفر در دسترس (ppm)	پتاسیم در دسترس (ppm)	ماده آلی (٪)	کربن آلی (٪)	نیتروژن کل (٪)	نیترات (mg/kg)	نیتروژن آمونیاکی (mg/kg)
خاک جزیره سیری	۱۰/۳	۲۶۴	۰/۷۹	۰/۳۹	۰/۹۰	۴۹/۲	۵/۴

1. Scanning Fluorescence Detector
2. Flow Rate
3. Most Probable Number

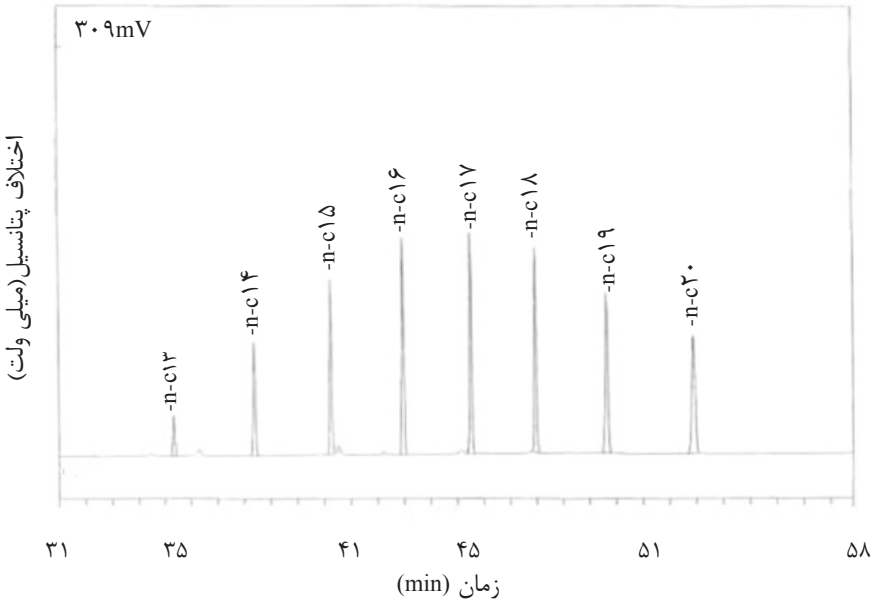


شکل ۲- یک نمونه از کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC میکروکازم آلکان (هفته ششم)

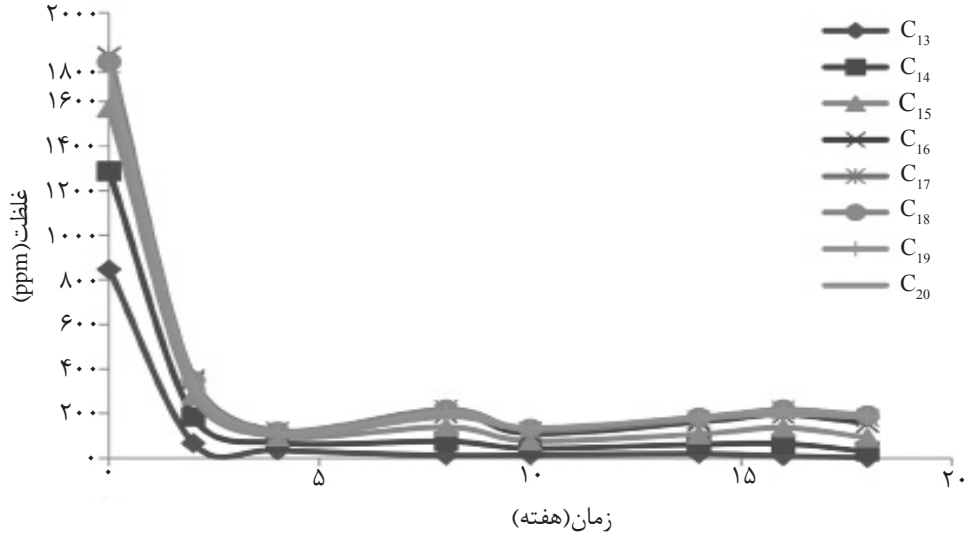
بررسی میزان حذف آلودگی در میکروکازم‌ها آنالیز کروماتوگرام‌های حاصل از آزمایش‌های GC و HPLC نشان داد که در هر سه میکروکازم کاهش چشم‌گیری درغلظت هیدروکربن‌ها رخ داده است. نتایج هریک از آنالیزها به تفکیک نوع میکروکازم در ادامه شرح داده شده است.

میکروکازم آلکان

شکل ۲ نمونه‌ای ازطیف حاصل از کروماتوگرافی گازی انجام شده بر روی نمونه هفته ششم را نشان می‌دهد. نمودار شکل ۳ کاهش غلظت آلکان‌ها را بر حسب زمان نشان می‌دهد. همان‌طور که در این نمودار مشخص است، بخش اعظمی از آلکان‌ها در همان یک ماه نخست تجزیه شده‌اند و در پایان ۶ ماه بررسی مقدار آنها تقریبا به صفر رسیده است. همان‌گونه که در شکل ۴ مشخص است، بعد از گذشت شش ماه C_{13} کمترین مقدار و C_{20} بیش ترین مقدار آلکان‌های باقی مانده در محیط را تشکیل می‌دهند.



شکل ۳- یک نمونه از کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC میکروکازم آلکان (هفته ششم)

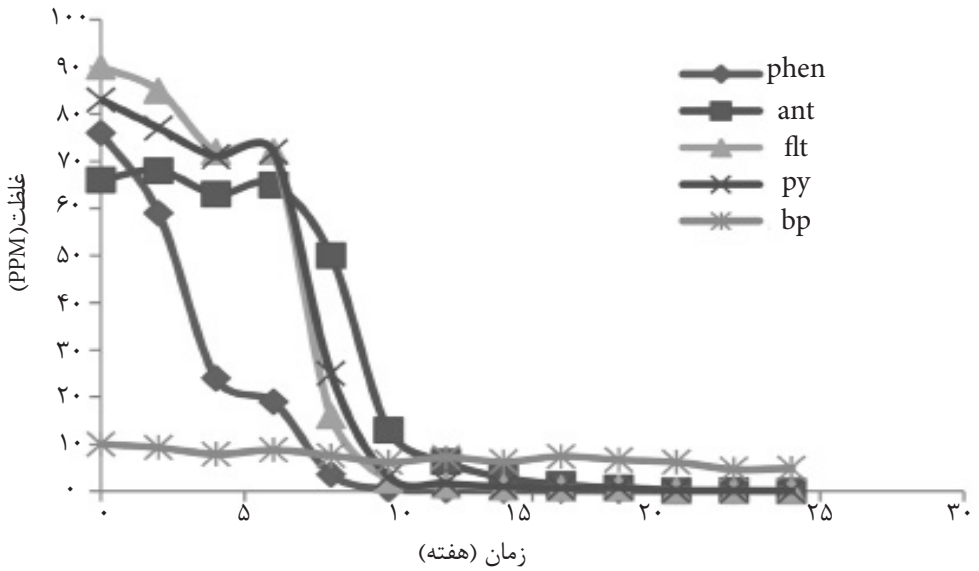


شکل ۴- مقادیر آلکان‌های باقیمانده در میکروکازم A در طول شش ماه بررسی به تفکیک نوع آلکان‌ها

علت این امر این است که هر چه طول زنجیره هیدروکربنی کوچکتر باشد زیست دسترس‌پذیری آن بیشتر و در نتیجه تجزیه آن آسان‌تر است و آن ترکیب زودتر از محیط حذف می‌شود. در پژوهشی که مارگزین و همکارانش در مورد تجزیه آلکان‌ها در شرایط آزمایشگاه و توسط یک کنسرسیوم میکربی در سال ۲۰۱۲ داشتند نیز مشاهده کردند که طول زنجیره آلکان به طور معنی داری در سرعت تجزیه آلکان‌ها موثر است [۱۲]. به این ترتیب که بعد از ۱۴ روز گرماگذاری C_{12} به طور کامل تجزیه شد، درحالی‌که C_{16} به میزان ۷۵٪ و C_{18} فقط ۲۹٪ تجزیه شدند. البته در این پژوهش نهایتا مقداری که از همه انواع آلکان‌ها در محیط باقی مانده نسبت به مقدار اولیه آنها ناچیز است، به طوری که بعد از گذشت دو ماه بیش از ۹۰٪ همه انواع آلکان‌ها تجزیه شده‌اند و می‌توان گفت تقریبا تمام آلکان‌های موجود در محیط پس از گذشت شش ماه توسط میکرو ارگانیسم‌های خاک مصرف شده‌اند. در طول دوره بررسی، میکروکازم‌ها در معرض نور مستقیم خورشید نبودند (برخلاف آنچه که در محیط طبیعی اتفاق می‌افتد) و درب آنها هم به جز در مواقع آب دادن همواره بسته بود. بنابراین می‌توان گفت که کاهشی که در مقدار هیدروکربن‌ها در همه میکروکازم‌ها مشاهده می‌شود در نتیجه فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد. همان‌طور که در نمودار شمارش باکتری‌های هتروتروف (شکل ۲) مشخص است، در طی هفته اول و بلافاصله بعد از افزودن آب، نیترات، فسفات و هیدروکربن‌ها رشد باکتری‌ها افزایش پیدا کرده و جمعیت باکتری‌های هتروتروف به هزار برابر مقدار اولیه خود رسیده است. اما بعد از گذشت پنج ماه و مصرف کامل آلکان‌ها مقدار باکتری‌ها افت نموده و از آن به بعد در یک مقدار نسبتا ثابت ۵×۱۰^{۸} باقی مانده است.

میکروکازم هیدروکربن‌های آروماتیک (PAH)

شکل ۵ کاهش غلظت **PAH**ها را بر حسب زمان نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار مشخص است، ترکیبات ۳ حلقه‌ای (آنتراسن وفنانترن) و ۴ حلقه‌ای (فلورانتن و پایرن) در عرض ۱۰ هفته تجزیه شده و مقدارشان به حدود صفر رسیده است درحالیکه مقدار ترکیب ۵ حلقه‌ای بنزوآلفا پایرن با گذشت ۶ ماه به نصف غلظت اولیه خود رسیده است.



شکل ۵- مقادیر PAHهای باقی‌مانده در میکروکازم P در طول شش ماه بررسی به تفکیک نوع آروماتیک‌ها

همانطور که در نمودار شکل ۴ مشخص است و همان‌گونه که در مورد میکروکازم آلکان هم ذکر شد، بلافاصله پس از افزودن آب و مواد مغذی جمعیت باکتری‌های هتروتروف شروع به افزایش کرده و بعد از گذشت یک هفته و مصرف منابع کربن سهل الوصول‌تر، جمعیت باکتری‌ها کاهش پیدا کرده است. نوسان‌هایی که در ادامه در جمعیت باکتری‌های هتروتروف دیده می‌شود نشانگر تغییر منبع کربن مورد استفاده میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشد، زیرا در هر نقطه‌ای که صعود نمودار جمعیت مشاهده می‌شود، شروع نزول یک نوع PAH مشاهده می‌شود (به عنوان مثال بین نقطه ۳ و ۴ شاهد ایجاد شیب صعودی در جمعیت باکتری‌ها هستیم و درعین حال در همین نقاط شاهد شروع شیب نزولی ترکیبی مثل آنتراسن می‌باشیم و در نقطه بین ۶ و ۷ افزایش شیب جمعیت با ایجاد شیب نزولی در مقدار پایرن همراه است).

نکته قابل ذکر این است که در تغییر منبع کربن دو اتفاق ممکن است افتاده باشد: یا همان باکتری‌ها با تغییر بیان ژن قابلیت استفاده از منابع کربن جدید را پیدا کرده‌اند؛ یا اینکه به نوعی تغییر جمعیت[1] رخ داده باشد و با کم شدن یک گروه میکروارگانیسم‌ها گروه‌های دیگری در محیط زیاد شده باشند. نکته‌ای که به خصوص در مقایسه میان جمعیت باکتری‌های هتروتروف در میکروکازم آلکان و میکروکازم PAH حائز اهمیت است این است که حداکثر جمعیت باکتری‌های هتروتروف در میکروکازم PAH ۴×۱۰^{۷} است، در حالیکه این مقدار برای میکروکازم آلکان به حدود ۴×۱۰^{۹} می‌رسد. علت این پدیده می‌تواند به خاطر این باشد که اولاً آلکان‌ها به علت حلالیت بیش‌تر در آب زیست دسترس‌پذیری بیش‌تری برای میکروارگانیسم‌ها دارند و راحت‌تر تجزیه می‌شوند. در نتیجه به علت وجود مقدار بیش‌تر منبع کربن قابل دسترس در میکروکازم آلکان نسبت به میکروکازم PAH، جمعیت کل باکتری‌های هتروتروف در میکروکازم آلکان به صورت قابل توجهی بالاتر از میکروکازم PAH می‌باشد. علاوه براین این تفاوت در تعداد باکتری‌های می‌تواند نشان دهنده تنوع بیشتر باکتری‌های تجزیه کننده آلکان در مقایسه با PAH نیز باشد.

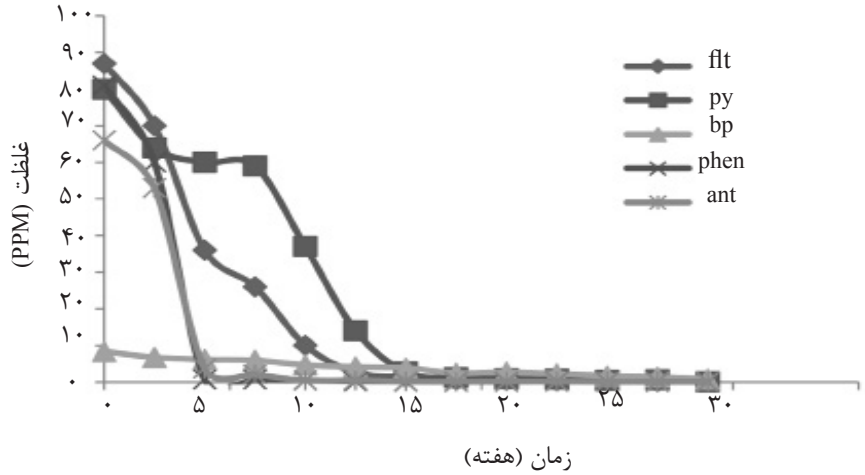
1. Succession

در مطالعه‌ای که Moon و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی تجزیه خاک در یک میدان گازی با میزان آلودگی حدود PAH ۲۰۰ µgr در هر گرم خاک در کره جنوبی انجام دادند، پتانسیل تجزیه زیستی میکروارگانیسم‌های بومی خاک را با روش تنفس سنجی (محاسبه میزان تجزیه بر اساس میزان دی اکسید کربن رادیو اکتیو آزاد شده از میکروکازم‌ها) و در یک دوره ۳۵ روزه سنجش کردند. در خاک‌هایی که به طور مصنوعی آلوده شده بودند، فنانترن بیش‌ترین میزان تجزیه را نشان داد(حدود۶۰٪) و مقدار تجزیه PAHها به ترتیب فنانترن> آنتراسن> پایرن> بنزوآلفاپایرن بود. در خاک‌هایی که ذاتا آلودگی داشتند نیز ابتدا فنانترن (حدود۶۰٪) و پس از آن آنتراسن (حدود۳۰٪) بیشترین میزان تجزیه را نشان دادند. اما برخلاف نتایجی که در خاک‌های غیر آلوده مشاهده شد، بنزوآلفاپایرن بیشتر از پایرن(۲۰٪ در برابر ۱۰٪) تجزیه شد [۱۳].

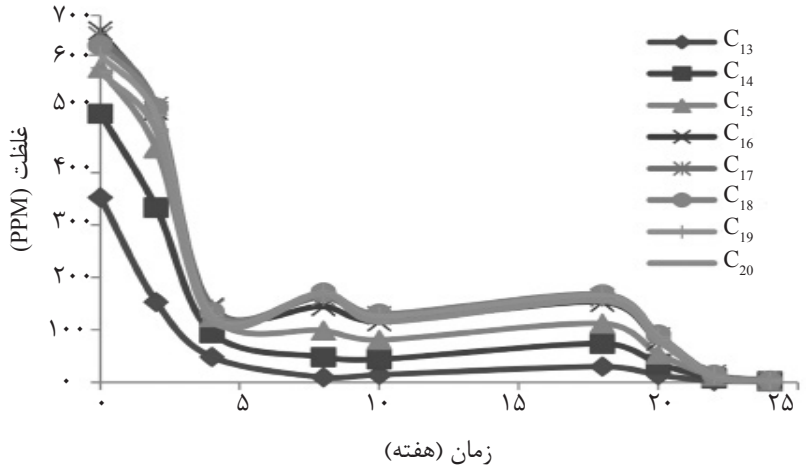
در پژوهش حاضر همان‌طور که در نمودار غلظت PAHهای باقی مانده مشاهده می‌شود، بعد از گذشت همین مدت زمان یعنی ۳۵ روز میزان تجزیه فنانترن حدود ۷۵٪ ، میزان تجزیه آنتراسن تنها حدود ۱٪ ، فلورانتن۲۰٪، پایرن ۱۳٪ و بالاخره میزان تجزیه بنزوآلفاپایرن ۱۲٪ می‌باشد. بنابراین در پژوهش حاضر هم میزان تجزیه PAHها مستقیما به تعداد حلقه آنها بستگی داشت. البته مقدار همه PAHها به غیر از بنزوآلفاپایرن بعد از گذشت شش ماه تقریبا به صفر رسیده است در حالی‌که مقدار این ترکیب ۵ حلقه‌ای بعد از گذشت این مدت تنها به نیمی از مقدار اولیه خود کاهش پیدا کرده است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بنزوآلفاپایرن به عنوان نماینده PAHهای با وزن مولکولی بالا و آلاینده‌های آلی ماندگار در محیط می‌باشد [۱۴] و به علت سرطان‌زا بودن و پتانسیل بالایی که برای تجمع در موجودات زنده دارد، سلامت محیط زیست را تهدید می‌کند [۱۵].

میکروکازم هیدروکربن‌های آروماتیک و آلکان‌ها (PA)

همان‌طور که قبلا گفته شد در میکروکازم PA به منظور بررسی روند تجزیه و وجود کومتابولیسم احتمالی در حضور همزمان هر دو نوع ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک، هر دو نوع این ترکیبات به محیط افزوده شدند. شکل‌های ۶ و ۷ روند کاهش این ترکیبات را درطول زمان نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار شکل ۵ مشخص است، در میکروکازم PA هم مانند میکروکازم A ابتدا آلکان‌های سبک‌تر و سپس آلکان‌های سنگین‌تر توسط میکروکازم‌ها مصرف شده‌اند و نهایتا پس از گذشت شش ماه مقدار همه آلکان‌ها تقریبا به صفر رسیده است.



شکل ۶- مقادیر PAHهای باقیمانده در میکروکازم PA در طول شش ماه بررسی به تفکیک نوع آروماتیک‌ها



شکل ۷- مقادیر آلکان‌های باقیمانده در میکروکازم PA در طول شش ماه بررسی به تفکیک نوع آلکان‌ها

در شکل ۶ مشاهده می‌شود که همانند میکروکازم P ابتدا دو ترکیب ساده‌تر سه حلقه‌ای آنتراسن و فنانترن توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه شدند و پس از اینکه مقدار آنها کاهش پیدا کرد، ترکیبات چهارحلقه‌ای فلورانتن و پایرن مصرف شدند. بنزو آلفا پایرن هم مانند آنچه که در میکروکازم P اتفاق می‌افتد به علت زیست‌دسترس‌پذیری پایین و در نتیجه تجزیه‌پذیری اندک با شیب بسیار ملایمی کاهش پیدا می‌کند. نکته قابل توجهی که در مقایسه این دو میکروکازم به نظر می‌رسد این است که در میکروکازم PA نسبت به میکروکازم P ترکیبات PAH زودتر تجزیه شده و مقدارشان به صفر نزدیک شده است. (به عنوان مثال در میکروکازم PA مقدار دو ترکیب آنتراسن و فنانترن تنها بعد از گذشت بیست و هشت روز تقریبا به صفر رسیده است در حالی‌که مقدار همین ترکیبات در میکروکازم P در روز بیش و هشتم همچنان بیش از ۲۰ PPM می‌باشد و بعد از گذشت ۷۰ روز به مقدار صفر نزدیک شده است). در مورد بنزو آلفاپایرن هم اگرچه مقدار آن در هیچ کدام از میکروکازم‌ها هرگز به صفر نرسیده است اما مقدار کاهش آن در میکروکازم PA تقریبا ۱۰برابر میکروکازم P می‌باشد (مقدار ۴/۹ در برابر ۰/۷۷) همه این مشاهدات وجود پدیده کومتابولیسم را در میکروکازم PA تایید می‌کند. وجود پدیده کومتابولیسم در تجزیه آلکان‌های شاخه‌دار برای اولین بار توسط Jamison و همکاران در سال ۱۹۷۶ مشاهده شد. همچنین کومتابولیسم در هنگام تجزیه ۲و۲ دی متیل بوتان و۲و۳ دی متیل بوتان توسط سویه M. Austroafricanum IFP 2173 و همچنین میکروفلوری از پساب شهری مشاهده شد [۱۶]. در این شرایط تجزیه ایزوآلکان‌ها مستلزم حضور هیدروکربن‌های دیگری است که برای رشد میکروارگانیسم‌ها ضروری می‌باشد. اختصاصیت پایین آنزیم‌های دخیل در تجزیه آلکان‌ها وجود پدیده کومتابولیسم را توجیه می‌کند.

وجود پدیده کومتابولیسم به خصوص در شکست پلی‌آروماتیک‌های با وزن مولکولی بالا (دارای ۵ یا ۶ حلقه) که تاکنون گزارشی مبنی بر اینکه این ترکیبات به تنهایی بتوانند به عنوان جایگزین برای رشد میکرو ارگانیسمی قرار بگیرند مشاهده نشده، مهم است. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که شکست اولیه این ترکیبات تنها به صورت کومتابولیسم و در حضور سویه‌هایی که بر روی دیگر PAHها رشد کرده‌اند رخ می‌دهد[۱۷]. جمعیت باکتری‌های هتروتروف هم در این میکروکازم در مقایسه با دو میکروکازم دیگر بالاتر می‌باشد.

جمعیت میکروبی خاک آلوده و تنوع میکرو ارگانیسم‌های موجود در منطقه یکی دیگر از عوامل اصلی موثر در روند تجزیه زیستی ترکیبات نفتی است.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Chikere و همکارانش در میکروکازم‌هایی که با استفاده از خاک منطقه‌ای در نیجریه تهیه شده بود انجام شد، جمعیت قالب میکروبی در طی تجزیه ترکیبات نفتی با استفاده از روش PCR-DGGE مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گونه‌هایی از جنس‌های Corynebacterium، Dietzia، Rhodococcus و Nocardioides به همراه تعداد زیادی از کلون‌های باکتریایی غیر قابل کشت، باکتری‌های غالب در فرآیند پاکسازی ترکیبات نفتی بوده‌اند [۱۸]. در مطالعه دیگری که توسط Silva و همکارانش انجام شد اثر تلقیح زیستی کنسرسیوم‌های باکتریایی و قارچی بر تجزیه زیستی هیدروکربن‌های پلی آروماتیک در مقایسه با خاک کنترل مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که افزودن کنسرسیوم باکتریا و قارچ‌ها به خاک جنگلی اثری بر حذف پلی آروماتیک‌های سبک مانند نفتالین، فنانترن و آنتراسن نداشت اما در مورد ترکیبات سنگین‌تری مانند پایرن، بنزوپایرن و بنزوآنتراسن سبب کند شدن تجزیه زیستی نیز گردید [۱۹]. Jacques و همکاران از یک کنسرسیوم میکروبی شامل باکتری‌های Mycobacterium fortuitum، Bacillus cereus، Mycobacterium sp.، Gordonia polyisoprenivorans و یک باکتری تجزیه کننده نفتالین متعلق به خانواده Microbacteriacea به همراه قارچی که به عنوان Fusarium oxysporum شناخته شد، برای افزایش تجزیه زیستی ترکیبات PAH استفاده کردند. این بررسی نشان داد که کنسرسیوم میکروبی فوق‌الذکر توانست در طی ۷۰ روز به ترتیب ۹۹٪، ۹۹٪ و ۹۷٪ از آنتراسن، فنانترن و پایرن را در خاک حذف نماید. در حالی که هنگامی که تنها از باکتری‌های بومی خاک (بدون تلقیح زیستی) استفاده شد، تجزیه قابل توجهی در این ترکیبات مشاهده نگردید [۲۰]. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقایسه نتایج حاصل از بررسی آزمایشگاهی اثر تلقیح زیستی بر حذف آلاینده‌های نفتی، نشان دهنده نتایج بعضا متناقض است. این تناقض احتمالا ناشی از آن است که فاکتورهای متعددی مانند انتخاب گونه یا گونه‌های مورد استفاده، اکولوژی میکروبی خاک، نوع آلاینده، محدودیت‌های محیطی و روش تلقیح کشت می‌تواند بر موفقیت یا عدم موفقیت این روش اثر بگذارد [۲۱].

نتیجه‌گیری

ایجاد دانش در خصوص نقش عوامل مختلف در پاک‌سازی زیستی آلاینده‌های نفتی و درک بهتر نقش جوامع میکربی موجود در مکان‌های آلوده، دیدگاه روشنی برای بهره بردن از باکتری‌های ساکن در این محیط‌ها ایجاد می‌کند. در این پژوهش از میکروکازم‌ها به عنوان یک مدل کوچک از اکوسیستم واقعی موجود در جزیره سیری، برای بررسی نقش ترکیب آلاینده نفتی در فرآیند پاکسازی زیستی، استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های بومی خاک این جزیره بلافاصله بعد از مواجهه شدن با این ترکیبات خود را برای مصرف این ترکیبات سازگار می‌کنند. این سازگاری در آلکان‌ها نسبت به PAH ها سریع‌تر می‌باشد. هنگامی که هر دو نوع آلاینده در محیط وجود دارند (مانند آنچه که در میکروکازم PA اتفاق افتاد)، رابطه‌ای به نام کومتابولیسم بین باکتری‌های ساکن در این محیط به وجود می‌آید که منجر به حذف کامل‌تر و سریع‌تر آلاینده‌ها می‌شود. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که خاک جزیره سیری از توانمندی میکروبی نسبتا بالایی برخوردار است و پتانسیل زیستی لازم برای حذف ترکیبات هیدروکربنی آلیفاتیک و آروماتیک را دارد و ضمنا آلودگی‌های جنبی مانند فلزات سنگین، شوری و شرایط اسیدی یا قلیایی هم مشکلی برای فعالیت میکروبی خاک سیری نیستند. بنابراین می‌توان از فن‌آوری پاک‌سازی زیستی به منظور حذف آلودگی‌های نفتی در این جزیره بهره جست. البته برای بررسی دقیق‌تر تنوع میکروبی پیشنهاد می‌گردد با کمک روش‌های کشت سویه‌های غالب جداسازی و از دیدگاه تبارزایی با روش‌های مولکولی شناسایی شوند و نیز پایش دینامیک جمعیت‌های میکروبی با کمک روش‌های بدون نیاز به کشت همانند PCR-DGGE انجام پذیرد.

مراجع

[1]. Cappello S., Yakimov M. M. and Timmis K. N., "*Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*," Springer-Verlag., pp. 1737-1748, 2010.

[۲]. دستغیب س. م. م.، پایان‌نامه، بررسی تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی در شرایط شور توسط باکتری‌های هالوفیل یا هالوتالرنت، دانشکده علوم، دانشگاه تهران ۱۳۹۰.

[3]. Balba M. T., Al-Awadhi., and Al-Daher N. R., "*Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation*," Journal of Microbiological Methods., Vol. 32, pp.155–164, 1998.

[4]. Fritsche W. and Hofrichter M., "*Principles of bacterial degradation, Biotechnology: Environmental processes*," Vol. 11b, Second Edition, 2000.

[5]. Haritash A. K. and Kaushik C. P., "*Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review*," Journal of Hazardous Materials., Vol. 169, No. 1, pp. 1-15, 2009.

[6]. Rahman K. S. M., Rahman T. J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R., and Banat I. M., "*Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients*," Bioresource Technology., Vol. 90, No. 2, pp. 159-168, 2003.

[7]. ChaIneau C. H., Morel J. L., and Oudot J., "*Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings*," Environmental Science & Technology, Vol. 29, No. 6, pp. 1615-1621, 1995.

[8]. Carter Martin R., ed. "*Soil sampling and methods of analysis*," CRC Press, 1993.

[9]. Margesin R. and Franz S., "*Manual for soil analysis- monitoring and assessing soil bioremediation. soil biology*," Springer Verlag, Vol. 359, 2005.

[10]. US EPA, Method 550, "*Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection*," USA, 1990.

[11]. Sutton S., "*The most probable number method and Its uses in enumeration, qualification, and validation,*"- Journal of Validation Technology, Vol. 16, No. 3, 2010.

[12]. Margesin R., Moertelmaier C., and Mair J., "*Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes,phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains*," International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 84, pp. 185-191, 2012.

[13]. Moon H. S., Kahng H. Y., Kim J. Y., Kukor J. J., and Nam K., "*Determination of biodegradation potential by two culture-independent methods in PAH-contaminated soils*," Environmental Pollution, Vol. 140, pp. 536-545, 2006.

[14]. "*National Toxicological Program (NTP),*" Tenth Report on Carcinogens. Report of the NTP on Carcinogens. National Academy Press, 2002.

[15]. Cerniglia C. E., "*Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*," Biodegradation, Vol. 3, No. 2, pp. 351-368, 1992.

[16]. Solano-Serena F., Marchal R., Ropars M., Lebeault J., and Vandecasteele J., "*Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance, and fate of individual compound*," Journal of Applied Microbiology, Vol. 86, pp.1008-1016, 1999.

[17]. Morales M., Velazquez E., Jan J., Revah S., Gonzalez U, and Razo-Flores E., "Methyl tert-butyl ether bio-

degradation by microbial consortia obtained from soil samples of gasoline-polluted sites in Mexico," Biotechnology Letters, Vol. 26, pp. 269–275, 2004.

[18]. Chikere C. B., Surridge K., Okpokwasili G. C., and Cloete T. E., "*Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcosms during nutrient-enhanced bioremediation*," Waste Management & Research, Vol. 30, No. 3, pp. 225-236, 2012.

[19]. Silva Í. S., Santos E. D. C. D., Menezes C. R. D., Faria A. F. D., Franciscon E., Grossman M., and Durrant L. R., "*Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia*," Bioresource Technology, Vol. 100, No. 20, pp. 4669-4675, 2009.

[20]. Jacques R. J., Okeke B. C., Bento F. M., Teixeira A. S., Peralba M. C., and Camargo F. A., "*Icrobial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil*," Bioresource Technology, Vol. 99, No. 7, pp. 2637-2643, 2008.

[21]. Tyagi M., da Fonseca M. M. R., and de Carvalho C. C., "*Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes*," Biodegradation, Vol. 22, No. 2, pp. 231-241, 2011.