نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۷ شماره ۴صفحه‌های ۱۴۹ تا ۱۵۸/ سال ۱۳۹۶

ارزیابی تجزیه زیستی هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای با استفاده از باکتری‌های جدا شده از خاک شهر و پالایشگاه تبریز

خسروصدیق بیان *[۱]، مهناز مظاهری اسدی[۲]،عباس فرازمند[۳]، علیرضا منادی سفیدان[۴]، ناصرعلی اصغرزاد[۵]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۸/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۶

[۱]- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

[۲]- استاد بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

[۳]- استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

[۴]- دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۵]- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:sadighbayan@yahoo.com

چکیده

آلودگی خاک‌ها به هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی، یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست محیطی در برخی از نقاط کشور به‌ویژه در اطراف پالایشگاه‌های نفتی است. جهت پاک‌سازی این مواد روش‌های بیولوژیکی به جهت ارزان و قابل دسترس بودن بر سایر روش‌ها ترجیح داده می‌شود. میکروارگانیسم‌های موجود در خاک از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و نهایتاًتولید آب،CO_2، زیست توده و مواد بی‌ضرر می‌کنند. در این مطالعه، نمونه‌هایی از خاک‌های غیر آلوده شهر وآلوده پالایشگاه تبریز برداشته و ۱۰۰ کلنی میکروب خالص پس از کشت در محیطYGM و SCA بدست آمد. هیدروکربن فنانترن با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط MHB تهیه نموده و جمعیت ثابتی از باکتری‌های فوق به‌صورت جداگانه اضافه شد، به‌مدت یک هفته در ۲۸°C با شرایط شیک ۱۳۰ rpm انکوباسیون گردید. میزان تخریب فنانترن با اسپکتروفتومتر، ارزیابی و با روش کروماتوگرافی TLC از کاهش ترکیب آروماتیک اطمینان حاصل گردید. تعداد ۸۷ باکتری تجزیه کنندهٔ فنانترن جدا شد و میزان تخریب آنها ۹۳/۸-۳/۲٪ مشخص گردید. نمونه‌ای از متابولیت‌های ثانویه که بیشترین درصد تخریب را داشت جهت شناسایی مورد تجزیه GC-Mass قرار گرفت و مشخص گردید در اثر تجزیه بیولوژیکی فنانترن چند ماده حدواسط بدون خواص سمی حاصل شده است. جدایه‌های با توانایی تخریب بیولوژیکی بیش از ۵۰٪ مورد شناسایی قرار گرفتند. با شناسایی باکتری‌های مؤثر و ایجاد شرایط بهینه می‌توان درمقیاس صنعتی و کاربردی اقدام به پاک‌سازی خاک‌های آلوده ازهیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک کرد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تجزیه بیولوژیک، سموم آروماتیک، میکروارگانیسم‌های خاک، هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای

Investigation of Biodegradation Potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon with Bacteria Isolated from Tabriz City and Petroleum Refinery Soils

KhSadighbayan[*1], M Mazaheri assadi[2], A Farazmand[3], AR Monadi[4], N Aliasgharzad[5]

Received: 25 October 2014 Accepted: 6 June 2017

[1-] Ph.D. Student of Microbiology, Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
[2-] Prof., of Biotechnology, Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
[3-] Assiantst. Prof of Molecular Genetics, Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran
[4-] Associate. Prof of Microbiology, Dept. of Microbiology, College of Medicine, Univ. of Tehran Medicine, Iran
[5-] Prof., of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Sci, Univ. of Tabriz, Iran
[*]Corresponding Author, Email: sadighbayan@yahoo.com

Abstract

Petroleum aromatic hydrocarbons are important sources of soil and environmental pollution in our country especially around oil refineries. In order to remove these pollutants, biological methods using native microorganisms of oil contaminated soils are preferred because of their cheapness and availability. Existing soil microorganisms use these hydrocarbons as carbon and energy sources and finally produce water, CO_2, biomass and harmless materials. In the present study, the sampling was conducted from different unpolluted soils of Tabriz city and oil-polluted soils of Tabriz Petroleum Refinery. The soil suspensions were cultured in YGM and SCA media and finally, 100 microbial isolates were obtained. Phenanthrene at a rate of 1000 mg/L was added to the MHB medium and then the fixed amounts of these bacterial isolates were added separately. They were incubated in shaker with 130 rpm, at 28˚C for one week. The rate of phenanthrene destruction was evaluated by spectro photometery. Thereafter the reliability of primary aromatic compounds was assayed by TLC method. Eighty-seven bacterial isolates with phenanthrene destruction rates of 3.2-93.8% were selected. Some secondary metabolites originated from destruction of hydrocarbons were subjected to the GC-Mass analysis. Some non- toxic mediatory substances were identified as result of phenanthrene biological degradation. Bacterial isolates with possessing of phenanthrene degradation up to 50% were identified. By improving the growth and proliferation of effective bacteria it will be possible to remediate polluted soils from PAHs in industrial pilots.

Keywords: Aromatic toxins, Bioremediation, Polycyclic hydrocarbons, Soil contamination, Soil microorganisms

مقدمه

آلودگی‌های نفتی تقریباً یک پیامد اجتناب‌ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و مصرف انرژی است. مواد نفتی و مشتقات آن در اثر حمل و نقل یا ذخیره‌سازی ممکن است موجب آلودگی خاک شود. هر قدر مواد نفتی به‌عمق بیشتری از خاک نفوذ کنند رفع آلودگی آن مشکل‌تر خواهد بود (باتاچاریا و همکاران ۲۰۰۳، باراتی و واسودوان۲۰۰۱).

هیدروکربن‌های آروماتیک[1] جزء آلاینده‌های نفتی می‌باشند که از منابع مختلف شامل صنایع پتروشیمی، فاضلاب‌های صنعتی و خانگی، استخراج مواد نفتی و غیره وارد اکوسیستم‌های آب و خاک می‌شوند و به‌طور مستقیم به انسان منتقل و عوارضی از جمله سرطان را منجر می‌گردند (ورهوف و دگودئا ۱۹۹۸، ویلیامز۲۰۰۳). تاکنون ۱۶ ترکیب به‌عنوان آلاینده‌های مهم PAH در فهرست سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، آمده است. از مهمترین آنها می‌توان به نفتالین، آنتراسن، فنانترن، فلورن، کریزن، فلورانتن، پیرن و مشتقات آنها اشاره کرد (فردرو ۱۹۹۲، کورل و تروکلو ۱۹۹۶). فنانترن ($C_{14}H_{10}$) یک ماده بی‌رنگ به‌شکل کریستال بوده و در الکل، اتر، بنزن، دی‌سولفیدکربن و اسیداستیک محلول و در آب نامحلول است دارای وزن مخصوص ۱/۰۶۳، نقطه ذوب ۱۰۰/۳۵ °C و نقطه‌جوش۳۴۰°C، یک ماده سمی و سرطان‌زا می‌باشد، میزان آلوده‌کننده آن در هوا ۰/۰۲mg L^{-1} می‌باشد (میتینگ ۱۹۹۳). براساس مطالعات اولیه انجام شده درطرح تهیه اطلس آلاینده‌های خاک در ۱۱ استان کشور بیش از صدها نقطه آلوده در خاک‌های کشور وجود داشته که به آلاینده‌های مختلف از جمله فلزات سنگین، آلاینده‌های نفتی، سموم و ... آلوده بوده و محیط زیست و سلامت مردم را به‌شدت تهدید می‌کند.

این استان‌ها شامل آذربایجان‌شرقی، گلستان، همدان، قزوین، زنجان، بوشهر، هرمزگان، کرمانشاه، اصفهان، خوزستان و خراسان رضوی است (شیردم و همکاران ۲۰۰۹). برخی از باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها در خاک می‌توانند موجب تجزیه مواد نفتی شوند (ادر و همکاران ۲۰۰۶). پاک‌سازی زیستی یکی از روش‌های اصلی پاک‌سازی محیطی می‌باشد که در این روش از موجودات زنده به‌ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به‌منظور تجزیه آلاینده‌های محیطی و تبدیل آنها به ترکیبات غیرسمی استفاده می‌شوند (زانگ و همکاران ۲۰۰۴). این میکروارگانیسم‌ها ترکیبات هیدروکربنی را به دی‌اکسیدکربن، زیست توده ویا محصولات دیگر تبدیل می‌کنند (وایت ۱۹۹۷). اصولاً میکروارگانیسم‌ها به کمک ۳ فرآورده اصلی قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند: ۱-آنزیم‌ها: آنزیم‌های مونواکسیژناز و دی‌اکسیژناز مهمترین آنزیم‌های موثر در تجزیه هیدروکربن‌ها بوده و فرآورده حاصل از این آنزیم‌ها، الکل‌ها هستند (لیپر۱۹۹۴). ۲- بیوسورفکتانت‌ها: مواد بیولوژیک دارای گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز در سطح سلول هستند که به‌وسیله تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها از طریق امولسیونه کردن و آزاد کردن هیدروکربن‌های جذب‌شده به مواد آلی خاک، سبب افزایش زیست فراهمی ترکیبات هیدروفوبیک شده و باعث افزایش سرعت انتقال جرم می‌شود و به این وسیله به تسریع تجزیه زیستی کمک می‌کنند (عبدالطیف و همکاران ۲۰۰۹). ۳- اسیدها و حلال‌ها: بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادرند با استفاده از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی، اسیدها و حلال‌های مختلف نظیر استن، اتر، بنزن و اسید اگزالواستیک تولید کنند که باعث حل‌شدن هیدروکربن‌های نفتی می‌شود (آندرا و همکاران ۲۰۰۱). میکروارگانیسم‌های متعددی در این عمل نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از : *Pseudomonas ,Bacillus, Rhodococcus, Mycobacterium, Acinetobacter ,Staphylococcus, Clostridium, Proteus, Micrococcus* (رایموند و داون ۲۰۰۵،سائومین و همکاران ۱۹۹۹). اصولاً هیچ میکروارگانیسمی به‌تنهایی قادر به تجزیه کامل هیدروکربن‌های نفتی به دی‌اکسیدکربن و آب به‌عنوان محصول نهایی نیست.شناسایی میکروارگانسیم‌های تجزیه‌کننده مواد مختلف بخصوص مواد شیمیایی سمی از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت است، اول این که با جداسازی و تکثیر آنها می‌توان انواع مواد شیمیایی خطرناک را به مواد ساده‌تر و بی‌خطر تبدیل کرد، به‌طور مثال می‌توان با استفاده از همین میکروارگانسیم‌ها مواد آروماتیک را که سمی هستند به آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل کرد (باراتی و واسودوان ۲۰۰۱). در حال حاضر از انواع خاصی از باکتری‌ها برای از بین بردن لکه‌های نفتی در دریاها و همچنین آب‌های زیرزمینی و خاک‌ها استفاده می‌شود، از طرفی محققان بسیاری تلاش می‌کنند تا

[1]Aromatic hydrocarbons

میکروارگانیسم‌هایی را شناسایی کنند که توانایی بیشتری برای این‌کار داشته باشند، یا این که در شرایط مختلفی بتوانند این گونه مواد را تجزیه کنند. علاوه بر آن می‌توان بعد از شناسایی میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از دانش بیوتکنولوژی و روش‌های مهندسی ژنتیک، توانایی آنها را برای تجزیه مواد مختلف حلقوی و مشتقات آنها که یکی از آلاینده‌های مهم منابع آب و خاک محسوب می‌شوند افزایش داد (دینکلا و گابورد ۲۰۰۱). این مطالعه در نظر دارد توانایی ارگانیسم‌های جدا شده از خاک مناطق مختلف شهرتبریز در تجزیه فنانترن را به‌عنوان الگویی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای مورد بررسی قرار دهد. اهداف اصلی اجرای این پژوهش، شناسایی، حفاظت و به‌کار بستن پتانسیل میکروارگانسیم‌های بومی موجود در خاک‌های کشور است که مسلماً در مقایسه با نمونه‌های تجاری، سازگاری بهتری با شرایط اقلیمی کشور ما خواهند داشت. از این‌رو به‌منظور حفاظت از این ذخایر ژنتیکی، باید کلکسیون میکروبی مجهزی شکل بگیرد که قادر باشد با روش‌های جدید و کاملا مطمئن باکتری‌های جداسازی شده را شناسایی و برای مدت طولانی نگهداری کند.

مواد و روش‌ها

از۳۰ منطقه حاشیه خیابان‌های پرتردد داخل شهر وحومه تبریز و۱۰ ناحیه آلوده به مواد نفتی در پالایشگاه تبریز (شامل خاک‌های زیر تانک‌های ذخیره نفت و بنزین و حوضچه دپوی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی) جهت جداسازی باکتری‌های مؤثرنمونه برداری شد. پس از تهیه رقت‌های10^{-1} تا 10^{-4} از نمونه‌ها در سرم فیزیولوژیک، از هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت حاوی Starch Casein Agar و سپسYeast Glucose Malt Agar جهت تقویت رشد باکتری‌های خاک از قبیل *استرپتومایسس* و *نوکاردیا* کشت داده و در دمای $28\ ^{\circ}C$ به‌مدت یک هفته در انکوباتور قرار داده شد. در لوله‌های فالکون برروی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت Muller Hinton Broth در شرایط استریل ۲۵ میلی‌گرم از فنانترن خالص (Merck)، اضافه گردید (باتاچاریا و همکاران ۲۰۰۳). سپس از هرکدام از باکتری‌های خالص شده در محیط کشت Tryptic Soy Broth سوسپانسیون نیم مک فارلند ($1.5\times10^{8}cfuml^{-1}$) تهیه و ۰/۵ میلی‌لیتراز هرکدام به‌داخل لوله فالکون اضافه و در انکوباتور شیکردار در دمای$28\ ^{\circ}C$ و ۱۳۰rpm به‌مدت یک هفته قرارداده شد (آندرا و همکاران ۲۰۰۱). پس از طی این مدت جهت جداسازی فنانترن باقی‌مانده، محتویات لوله فالکون با ۱۰ میلی لیترتولوئن به قیف دکانتور منتقل و پس از چند بار به‌هم زدن، فاز بالایی که محتوی تولوئن و متابولیت باقیمانده است، در یک شیشه درب دار جمع‌آوری و تا موقع قرائت میزان جذب نوری در یخچال $4^{\circ}C$ نگهداری شد (سائومین و همکاران ۱۹۹۹). جهت محاسبه بیشترین جذب نوری (λ_{max}) فنانترن، رقت‌های مشخص از آن را در تولوئن تهیه و جذب نوری آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی در مقابل محلول شاهد (تولوئن خالص) قرائت و میزان λ_{max} فنانترن تعیین شد. در این طول موج، جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش نیز قرائت و با توجه به منحنی رسم شده میزان کاهش فنانترن در نمونه‌های مختلف مشاهده گردید (کورل و تراکلو ۱۹۹۶). درصد تخریب فنانترن توسط باکتری‌ها از رابطه مقابل محاسبه شد:

$$\text{درصد تخریب} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

A_1: جذب نوری هیدروکربن قبل از تخریب

A_2: جذب نوری هیدروکربن بعد از تخریب توسط جدایه

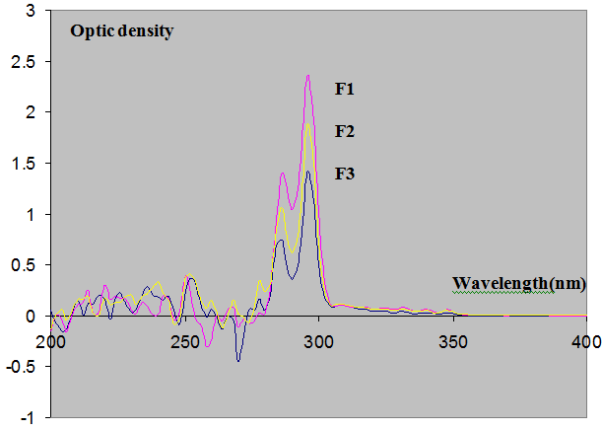
برای مشخص کردن نوع و مقدار ترکیب متابولیت حاصل از بیشترین پتانسیل تخریبی، محصول پس از تیمار جدایه مورد نظر، توسط دستگاه GC-Mass (مدل Agilent ساخت امریکا) مورد تجزیه و ارزیابی قرار داده شد (باردی و همکاران ۲۰۰۰). جهت شناسایی جنس باکتری‌های مؤثر، جدایه‌هایی که باعث تخریب هیدروکربن فنانترن(جمعاً ۱۲ جدایه) با میزان تخریب بیش از ۵۰٪ گردیدند، در محیط کشت مناسب (TSB, YGM) نگهداری شده و جهت بدست آوردن باندهای مورد نظر برای توالی‌یابی آنها، ابتدا استخراج DNA باکتری با بافرهای خاص انجام گرفته، واکنش PCR (مدل Techneh512 ساخت آمریکا) با حجم$50\mu L$ انجام شد. بعد از الکتروفورز محصول PCR و به‌دست آوردن باندهای مورد نظر بر

روی ژل آگارز، باندها با استفاده از تیغ جراحی از روی ژل بریده شده و با استفاده از کیت استخراج از ژل کیاژن، باند بریده شده از روی ژل آگارز استخراج شده و به شرکت کروژن کره جهت توالی‌یابی ارسال گردید (سکان و همکاران ۲۰۰۷).

نتایج وبحث

در اثر کشت نمونه‌های مختلف خاک، ۱۰۰ جدایه باکتری خالص شامل ۱۴ جدایه میکروبی مربوط به پالایشگاه تبریز با کدهای G_1 تا G_{14} و ۸۶ جدایه خالص شده از مناطق مختلف شهر تبریز بدست آمد. جمعا ۸۷ جدایه باکتریایی توانایی تجزیه و تخریب فنانترن در شرایط درون شیشه‌ای را نشان دادند. پس از اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌های استاندارد فنانترن در مقابل شاهد تولوئن درمحدوده طول موج ۲۵۰ –۵۰۰nm، λ_{max} فنانترن، ۲۹۶nm تعیین شد.

(شکل ۱).



شکل ۱- طیف جذبی مربوط به محلول‌های استاندارد برای تعیین λ_{max} فنانترن.

غلظت محلول‌های استاندارد فنانترن: F_1=۲۵، F_2=۱۶/۶، F_3=۱۲/۵ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر.

مقدار جذب نوری محلول‌های استاندارد فنانترن:

F_1=۲/۳۶۳، F_2=۱/۸۸، F_3=۱/۴۲ .

طیف جذبی نمونه‌های تیمار شده که برابر با میزان فنانترن باقی‌مانده پس از فرآیند تخریب بیولوژیک می‌باشد، در طول موج ۲۹۶ نانومتر قرائت و یادداشت شد. با استفاده از فرمول زیر

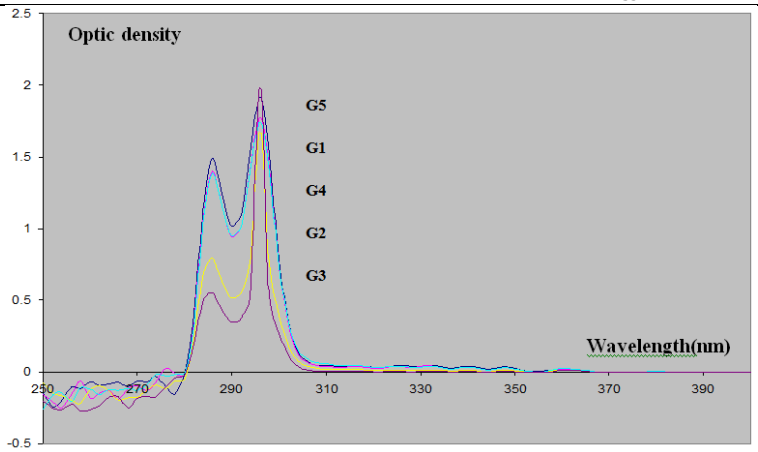
$$\text{درصد تخریب} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100$$

میزان تخریب بیولوژیکی فنانترن توسط میکروارگانیسم‌های مختلف مشخص گردید. یافته‌ها حکایت از درصدهای مختلف تخریب از۳/۲ تا ۹۳/۸ درصد فنانترن اولیه داشتند (شکل۲و جدول ۱).

جدول۱ – درصد تخریب بیولوژیکی فنانترن با جدایه‌های مختلف میکروبی.

ردیف	کد باکتری	درصد تخریب	ردیف	کد باکتری	درصد تخریب
۱	G_1	۲۳/۴	۵۱	M_{31}	۲۹/۲
۲	G_2	۲۹/۱	۵۲	M_{58}	۳۱
۳	G_3	۳۳/۳	۵۳	M_{60}	۱۳/۸
۴	G_4	۳۰/۳	۵۴	M_{61}	۰
۵	G_5	۲۰/۸	۵۵	M_{65}	۲۷/۸
۶	G_6	۲۹/۴	۵۶	M_{66}	۲۳
۷	G_7	۳۰/۱۱	۵۷	C_2	۲۳/٦
۸	G_8	۳/۳	۵۸	C_7	٤۰/۸
۹	G_9	۳٤/٦	۵۹	C_{15}	۳۰/٤

۱۰	G_{10}	۳۵/۷	٦۰	C_{17}	۲۲
۱۱	G_{11}	۲۵/۸	٦۱	C_{18}	۵۹/۲
۱۲	G_{12}	۱٤/۱	٦۲	B_2	۲۸
۱۳	G_{13}	۸۲/۱	٦۳	B_7	۲۳/۲
۱٤	G_{14}	۹۳/۸	٦٤	B_{19}	۵۳/۸
۱۵	F_6	۲۰/٦	٦۵	B_{20}	۵۸/۳
۱٦	F_9	۱۳/۷	٦٦	B_{25}	۲۲/۸
۱۷	F_{10}	۲۹/٤	٦۷	B_{27}	۳٤
۱۸	F_{11}	۱۸/۳	٦۸	B_{33}	۳۱/۲
۱۹	F_{12}	۲٦	٦۹	A_1	۰
۲۰	F_{13}	٦۲/۵	۷۰	A_2	۸/۲
۲۱	F_{14}	۱۷/٦	۷۱	A_3	۳٦/۸
۲۲	F_{19}	۱٦/٦	۷۲	A_4	۱۰
۲۳	F_{20}	۳٤/۳	۷۳	A_5	۳/۲
۲٤	F_{22}	۸/۸	۷٤	A_6	۳٤
۲۵	F_{24}	۲۱/۱	۷۵	A_7	۵٤/۷
۲٦	E_1	۱٤/۱	۷٦	A_8	۳۷/۸
۲۷	E_2	۳۲/۸	۷۷	A_9	۰
۲۸	E_3	٤۷/۲	۷۸	A_{10}	۳۳/٦
۲۹	E_4	۲۵/۲	۷۹	A_{11}	٤۲
۳۰	E_5	۲۹/٤	۸۰	A_{12}	۲۲/۸
۳۱	E_6	۳۸/۸	۸۱	A_{16}	۰
۳۲	E_7	۲۵/۳	۸۲	A_{17}	۰
۳۳	E_8	۱۰/۸	۸۳	A_{20}	۹/٦
۳٤	E_9	۱٤/۵	۸٤	A_{22}	۵۲/٦
۳۵	E_{10}	۲۳/٤	۸۵	A_{23}	٤۵/۷
۳٦	E_{11}	۲۷/٦	۸٦	A_{25}	۲۱/٦
۳۷	E_{12}	۰	۸۷	A_{26}	٦۸/۹
۳۸	E_{13}	۲۷	۸۸	A_{27}	۷/۸
۳۹	E_{14}	۰	۸۹	A_{28}	۳۰/۱
٤۰	E_{15}	۰	۹۰	A_{29}	۰
٤۱	E_{16}	۲۳/۲	۹۱	A_{30}	۲۵/۹
٤۲	E_{17}	۳۳/۲	۹۲	A_{31}	۱۸/٤
٤۳	E_{18}	٤۲/٤	۹۳	A_{32}	۳۹/٤
٤٤	E_{19}	۰	۹٤	A_{33}	۵۱/٦
٤۵	E_{20}	٤٤/۸	۹۵	A_{34}	۳۳/۲
٤٦	D_6	۰	۹٦	A_{35}	۵۹/٦
٤۷	D_{23}	۰	۹۷	A_{36}	٤/۹
٤۸	D_{26}	٤۲	۹۸	A_{37}	۲۸/٤
٤۹	D_{40}	۳٤	۹۹	A_{38}	٦۵/۸
۵۰	M_2	۲۷/٦	۱۰۰	A_{39}	۰



شکل۲- مثال‌هایی از طیف جذبی متابولیت‌های حاصل از تیمار فنانترن با جدایه‌های مختلف (مقادیر مختلف تجزیه فنانترن با جدایه‌ها) G_1=1.913, G_2=1.722, G_3=1.67, G_4=1.741, G_5=1.986: مقدار جذب نوری و فنانترن باقی‌مانده.

متابولیت حاصل از تخریب بیولوژیک جدایه G_{14} تحت تجزیه کروماتوگرافی گازی –اسپکترومتری جرمیGC-Mass قرار گرفته و نتایج مربوط که شامل نوع و ترکیب محصولات می‌باشد طبق جدول ۲ نمایش داده می‌شود.

جدول ۲- نتایج GC- Mass و متابولیت های حاصل از تجزیه بیولوژیکی فنانترن توسط جدایه G_{14} با بیشترین توان تخریب (۹۳٪/۸) در بین جدایه ها.

فنوتیپ باکتری	کد ماده شیمیایی Case number	متابولیت ثانویه	زمان بازدارندگی در ستون GC(min)	کد جدایه
Pseudomonas sp.	#000091	Naphthalene	٥/١١	G_{14}
	#000101	Benzen,1,1-methylenebis	٧/٣٩	
	#099027	6-8-dimethylbenzocyclooctene	٧/٩٠	
	#000128	ButylatedHydroxy toluene	٨/٠٣	
	#000481	Alpha Cadinol	٩/١٤	
	#065990	1,1-bisethane	٩/٢٢	
	#004926	Cyclohexane1-ethyl-1-methyl	٩/٥٨	
	#000085	Phenanthrene	١٠/٣٨	
	#000086	9H-Carbazole	١٠/٦٦	
	#000339	Retinoic acid, methyl ester	١١/٣٩	

جدایه‌هایی که دارای توان تجزیه بیولوژیکی فنانترن به میزان بیش از ۵۰٪ شدند پس از تعیین توالی مطابق جدول ۳ شناسایی گردید.

اصلاح زیستی یک فرآیند طبیعی است که توسط این روش، به‌جای آن که آلاینده‌ها را به‌سادگی دفن کرده و مسئولیت حذف آنها را به نسل بعدی بسپاریم، بازیافت می‌شوند به‌علاوه از دیدگاه عمومی، اصلاح زیستی مطلوب‌تر است و بسیاری از سازمان‌های جهانی استفاده از آن را برای اصلاح مکان‌های آسیب‌دیده به وسیله آلاینده‌های مختلف ترویج می‌کنند(چان یو و همکاران ۲۰۰۵).

جدول ۳- جنس باکتری‌های تجزیه کننده بیش از ۵۰٪ فنانترن.

ردیف	کد جدایه	درصد تخریب	جنس باکتری
١	G_{14}	٩٣/٨	*Pseudomonas sp.*
٢	G_{13}	٨٢/١	*Pseudomonas sp.*
٣	A_{26}	٦٨/٩	*Acinetobacter sp.*
٤	A_{38}	٦٥/٨	*Pseudomonas sp.*
٥	F_{13}	٦٢/٥	*Bacillus sp.*
٦	A_{35}	٥٩/٦	*Streptomyses sp.*
٧	C_{18}	٥٩/٢	*Pseudomonas sp.*
٨	B_{20}	٥٨/٣	*Achromobacter sp.*
٩	A_{7}	٥٤/٧	*Micrococcus sp.*
١٠	B_{19}	٥٣/٨	*Streptomyses*
١١	A_{22}	٥٢/٦	*Bacillus sp.*
١٢	A_{33}	٥١/٦	*Arthrobacter sp.*

با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعات انجام شده، باکتری‌های خاک کم وبیش پتانسیل تجزیه وتخریب هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای را دارند. جوسارا و فرانسیسکا (۱۹۹۹) نشان دادند که تخریب هیدروکربن‌های نفتی توسط میکروفلور خاک با افزودن نیتروژن و فسفر از ۱۱/۹ درصد به ۴۲/۹ درصد تحت شرایط انکوباسیون، در عرض ۲۸ روز افزایش می‌یابد. چان یو و همکاران (۲۰۰۵) در طرح پژوهشی خود در یک نمونه خاک کشاورزی، میزان تجزیه این مواد را از ۴۷٪ به ۶۲٪ رساندند. زانگ و همکاران (۲۰۰۴) ثابت کردند که

یک گونه *Pseudomonas* قادر به تجزیه فنانترن از ۰/۷ به ۳۵ میلی‌گرم در لیتر در حضور سورفکتانت تولید شده از آن باکتری بوده و نهایتاً منجر به تخریب فنانترن می‌شود. عبدالطیف و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود روی میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده PAHs موفق به شناسایی یک مخمر (AH70) جدا شده از خاک‌های آلوده نفتی گردیدند، این ارگانیسم قادر به تخریب نفتالین به میزان ۸۹/۷۶ درصد وفنانترن ۷۷/۲۱ درصد و پیرن ۶۰/۷۷ درصد و بنزوپیرن ۵۵/۵۳٪ در عرض ۱۰ روز می‌باشد. آندرا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند که از بین میکروارگانیسم‌های مطالعه شده در خاک دو گونه مخمر شناسایی گردید که گونه Yeast 984 قادر به تخریب ۱۰±۶۴٪ آنتراسن و گونه Yeast 870 قادر به تخریب ۱۰±۶۹٪ نفتالین می‌باشد. فارینازین (۲۰۰۴) با کنسرسیومی از باکتری‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* میزان تخریب بیولوژیکی هیدروکربن‌های نفتی در خاک را بررسی و مشاهده کرد غلظت باقی‌مانده نفت خام (C_{15}-C_{22}) بعد از ۳۰ روز، ۷۴/۳۴٪ و بعد از ۶۰ روز به ۱۹٪/۳۴ در محیط می‌رسد.

در این کار پژوهشی پس از جداسازی تعدادی از باکتری‌های خاک مناطق شهر تبریز و همچنین خاک مناطق آلوده به مواد نفتی پالایشگاه تبریز، اقدام به تخریب هیدروکربن فنانترن نموده و درصدهای مختلفی از تخریب مشاهده و گزارش داده شد. با توجه به نتایج و یافته‌های طرح، باکتری‌های جدا شده از خاک، پتانسیل تخریب و تجزیه هیدروکربن نفتی را در شرایط آزمایشگاهی، به‌طور قابل توجهی دارند که سوابق تحقیقاتی انجام شده نیز این موضوع را تأیید می‌کند. در این طرح از هیدروکربن پایدار با سمیت زیاد مثل فنانترن استفاده و مشاهده شد که از ۱۰۰ جدایه، ۸۷ باکتری قدرت تخریب فنانترن ما بین ۹۳/۸-۳/۲٪ را داشتند که ۱۲ جدایه، باعث تخریب بیش از ۵۰٪ شدند. بیشترین درصد تخریب فنانترن توسط باکتری *Pseudomonas* جداشده از خاک پالایشگاه تبریز ۹۳/۸٪ تعیین گردید که در مقالات مشابه نتایج مشابهی اخذ گردیده است. همچنین در این تحقیق از باکتری‌های موجود در خاک آلوده پالایشگاه نفت تبریز استفاده گردید و نهایتاً ۱۴ جدایه باکتری جدا شد. با بررسی نتایج آنها در مورد تخریب هیدروکربن‌ها می‌توان به پتانسیل باکتری‌های موجود در خاک‌های آلوده نفتی پی برد. باراتی و واسودوان (۲۰۰۱) در تحقیق خود ۱۵۰ جدایه باکتری تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی را از خاک‌های آلوده نفتی در هندوستان جدا کرده و نشان دادند که *P.citronellolis* از نظر توانایی تخریب ترکیبات آروماتیک و آلیفاتیک بر سایر جدایه‌ها غالب می‌باشد. ادر و همکاران (۲۰۰۶) یک جدایه *Pseudomonas* را از خاک آلوده به مواد نفتی از پالایشگاه نفت جدا کردند این باکتری با تولید سورفکتانت‌هایی، قدرت تخریب ۷۲٪ آنتراسن را دارا می‌باشد. با توجه به تحقیقات مذکور، طرح انجام یافته، نتایج مشابه و تأیید کننده داشته است و از این نظر که از میکروارگانیسم‌های بومی و غیربومی موجود در خاک‌های تبریز و پالایشگاه تبریز استفاده گردیده است، دارای جنبه نوآوری می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه را به‌صورت زیر می‌توان خلاصه کرد:

باکتری‌های خاک، پتانسیل بالقوه جهت تغذیه از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان انرژی و تجزیه آنها را دارند.

باکتری‌های خاک‌های آلوده به مواد نفتی دارای قدرت تجزیه‌کنندگی به‌مراتب بیشتری نسبت به انواع موجود در خاک‌های معمولی شهر می‌باشند.

پاک‌سازی بیولوژیکی به‌عنوان یک روش اصولی و مهم از سه جنبه اقتصادی، اکولوژیکی و اجتماعی می‌تواند در طرح‌های کاربردی و صنعتی مطرح باشد.

می‌توان با مجموعه‌ای از باکتری‌های مختلف جدا شده از خاک، عملیات پاک‌سازی مناطق آلوده به ترکیبات پایدار و بسیار سمی نفتی را انجام داد.

در این تحقیق که از باکتری‌های بومی خاک مناطق مختلف شهر و پالایشگاه تبریز استفاده شد، تلاش بر این بود که باکتری‌های موثر در تجزیه بیولوژیکی فنانترن (الگویی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک) مورد نظر را غربالگری کرده و در تحقیقات آتی، بعد از ژن تایپینگ و شناسایی آنها با بهره‌گیری از روش‌های غنی‌سازی سوش میکروبی، اقدام به بهینه‌سازی و تکثیر باکتری‌های مورد نظر کرده و آنها را برای آزمایشات تکمیلی و پایلوت نیمه صنعتی نگهداری نمود. با اجرای موفق این طرح، زیرساخت های لازم برای پیاده سازی فرآیند در مقیاس میدانی در آینده نزدیک فراهم می‌شود. متابولیت‌های تولید شده از باکتری‌های تجزیه کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی (سورفکتانت‌ها) اغلب باعث ادامه و سهولت عملیات تخریب و تجزیه بیولوژیکی گردیده و تولید این محصولات از سمیت اولیه مواد کاسته و حتی ممکن است نوع و ترکیب متابولیت‌ها از نظر کارآیی شیمیایی خیلی مهم و مفید باشند.

منابع مورد استفاده

Abd El Latif H, Saad A, Alamri S, Motamed E and Hashem M, 2009. Isolation and molecular genetic characterization of a yeast strain able to degrade petroleum polycyclic aromatic hydrocarbons. African Journal of Biotechnology 8(10): 2218-2223.

Andrea R, Clemente T, Anazawa A and Lucia R, 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. Brazilian Journal of Microbiology23(4): 127-133.

Barathi S and Vasudevan N, 2001.Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum- contaminated soil. Environment International - Journal - Elsevier26 (5-6):413-416.

Bardi L, Mattei A, Steffan S and Marzona M, 2000. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population withβ - cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability.Enzyme and Microbial Technology - Journal - Elsevier
27(9):709-713.

Bhattacharya D, Sarma P , Krishanan S, Mishra S and Lal B, 2003. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas sp*. African Journal of Biotechnology 20: 120-130.

Chanieau C, Rougeux G and Yepremian C, 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. Soil Biology and Biochemistry 37(8):1490-1497.

Curl E and Truclove B, 1996. The Rhizosphere. Springer, Verlag, Berlin.

Dinkla I.J.T and Gabor D.B, 2001. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (p WWO) plasmid. Applied and Environmental Microbiology 67: 3406-3412.

Eder C, Rodrigo J, Jacques F, Bento M, Carmo R, Peralba P, Selbach E and Flavio A, 2006. Anthracenebiodegradation and surface activity by an iron–stimulated *Pseudomonas sp*. Brazilian Journal of Microbiology50: 88-93.

Farinazleen M, 2004. Biodegradationof hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration& Biodegradation 54(1):61-67.

Fedorov M, 1992. Biological Fixation of Atmospheric Nitrogen, 4nd ed. Gosudarstv. Izdatel.Sel’ skokhoz, Let. Moscow (Russian).

Jussara P and Francisca P, 1999. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. International Biodeterioration& Biodegradation 44: 87-92.

Leeper G, 1994. Introduction to Soil Science, 4th ed. Melbourne, Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics (Basic Life Sc. Vol. 10), Management 68: 242-250.

Metting F, 1993. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management 3-25.

Raymond, W. and Duane T. (2007) An Introduction to Soils and Plant Growth. 11th ed. Prentice Hall: USA

Saumyen G, Catherine, A, Peters P and Jaffe J, 1999. Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene and pyrenemixtures. Environmental Management 68: 242-250.

Sekan P, Sudarat S. Suchart U, Suksiri V, Grams M, Prayad P, Gunter K and Annemarie H, 2007. Quantitative detection of the oil–degrading bacterium *Acinetobacter sp*. strain MUB1 by hybridization probe based real–time PCR. Microbiological Research 81(3): 1025-1032.

Shirdam R, NabibidhendiGh and Mehrdadi N, 2009. Removal of total petroleum hydrocarbons (TPHs) from oil-polluted soil in Iran. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering28(4): 105-113

White R, 1997. Priciples and Practice of Soils Science, Third Edition, Blackwell Ltd: USA.

Williams S, 2003. Bacteria in their natural environments (M. Fletcher & G.D. Floodgate). Academic Press, London, United Kingdom.

Verhoeff H and DeGoeda R, 1998. In Ecological Interactions in the Soil Plants, Microbes and Animals (ed. A.H. Fitter). BES Special Publicuation 4, Blackwell, Oxford:USA.

Zhang H, Kallimanis A, Koukkou A and Drainas C, 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greec soils. Applied Microbiology and Biotechnology 65: 124-131.