جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جداسازی باکتری‌های تجزیه کنندهٔ ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از دریاچهٔ طشک و بررسی اثر غلظت نمک بر آنها

فرشید کفیل‌زاده* ؛ حسین جاوید و حمید محمدی

Dr.Kafilzadeh@yahoo.com

گروه بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم صندوق پستی: ۷۴۱۳۵/۳۵۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۶

چکیده

دریاچه طشک در ناحیه حفاظت شده بختگان در استان فارس واقع شده است. در بین آلاینده‌های ورودی به دریاچه از طرق مختلف مانند رودخانه‌ها و روستاهای اطراف ،ترکیبات PAH از نظر ایجاد آسیبهای مختلف و مهم به انسان و محیط زیست از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. در آزمایش‌های انجام شده از نفتالین و آنتراسین بعنوان تنها منبع کربن برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH استفاده گردید. طبق آزمایش‌های انجام شده *Pseudomonas sp.* تنها باکتری تجزیه‌کننده PAH از آب و رسوب دریاچه جدا شد. در ایستگاه ده‌زیر، میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده نفتالین و آنتراسین در هر میلی‌لیتر آب (cfu/ml) بترتیب حدود ۲۷ و ۲۳ و در هر گرم رسوب (cfu/gr) همان ایستگاه ۵۷ و ۴۷ بدست آمد. در ایستگاه طشک، در هر میلی‌لیتر آب بترتیب ۶۷ و ۵۷ و در هر گرم رسوب ۱۲۰ و ۱۱۳ بوده و در ایستگاه گمبان، در هر میلی‌لیتر آب بترتیب ۱۲۷ و ۱۱۳ و در هر گرم رسوب ۱۶۳ و ۱۴۷ تعیین گردید. آزمونهای آماری حاکی از معنی‌دار بودن از نظر تفاوت میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH در آب و رسوب هر سه ایستگاه می‌باشد ($P< ۰/۰۵$). از طرفی غلظت بهینه نمک برای رشد و تجزیه PAH توسط *Pseudomonas sp.* ، حدود ۶ درصد می‌باشد که با گذشت زمان بر میزان تجزیه افزوده می‌شود.

لغات کلیدی : باکتری، ترکیبات آروماتیک، نمک، دریاچه طشک

مقدمه

دریاچه طشک در ناحیه حفاظت شده بختگان واقع شده است و از نظر تنوع گونه‌های گیاهی و جانوری و پرندگان مهاجر از جمله مناطق با ارزش و کم نظیر کشور است (جاوید ، ۱۳۸۴). اصلاح زیستی (Bioremediation) عبارت است از کاربرد میکروارگانیسمها برای حذف آلودگی‌های محیطی، که به دلیل زیستی و طبیعی بودن فرآیند، به آن تجزیه زیستی گویند. این روش برای پاکسازی مواد دفعی مایع و جامد غیرسمی، آبهای آلوده، مواد دفعی سمی زیان‌آور و پاکسازی آلودگیهای نفتی بکار می‌رود (Pala & Freire,2002). از آنجا که هر نمونه نفتی ازنظر ترکیبات متفاوت می‌باشد، گونه‌های مختلف میکروبی برای تجزیه آنها مورد نیاز است (Plotnikova & Altyntseva, 2001). میکروبها توسط واکنش‌های تنفسی هوازی و بی‌هوازی، تخمیر، کومتابولیسم و دهالوژنه کردن، این ترکیبات آلی

* نویسندهٔ مسئول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آلوده‌کننده را به ترکیبات کم ضررتر تبدیل کرده و از آنها بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (Atlas & Bortha, 1972).

برخی از تحقیقات انجام شده در پدیده اصلاح زیستی عبارتند از: جداسازی سویه جدیدی از *Pseudomonas* با توانایی تجزیه نفتالین توسط *Garcia-Vales* و همکاران در سال ۱۹۸۸، بررسی متابولیسم ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای در محیط‌های آبی توسط *Cerniglia* و همکاران در سال ۱۹۸۹، جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده فلورن توسط *Grifoll* و همکاران در سال ۱۹۹۲، جداسازی سویه‌هایی از باکتری *Mycobacteirum* با توانایی تجزیه فنانترن توسط Boldrin و همکاران در سال ۱۹۹۳، جداسازی و تعیین هویت سویه‌های جدید از باکتری *Marinobacter* با قابلیت تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی از رسوبات اطراف ریشه‌های گیاه حرا (Cited in Diaz & Grigson, 2000).

ورود هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) به محیط زیست، اثرات بسیار خطرناکی در زندگی انسان خواهد داشت. مشخص شده است که PAH ها عوامل بالقوه سرطان‌زا برای انسان می‌باشند و به سرعت وارد بدن شده و در بافت‌های چربی بدن ذخیره می‌شوند. قرار گرفتن به مدت کوتاه در معرض نفتالین باعث التهاب چشم و پوست می‌شود. اگر میزان نفتالین بالا باشد (بیشتر از ۱۰ppm)، سردرد، خستگی شدید و سرگیجه و حالت تهوع اتفاق می‌افتد. اثرات شدید نفتالین معمولاً ۲ تا ۴ روز پس از تماس بروز می‌کند و می‌تواند به صورت بیماری‌های مزمن درآید (Koch & Fuchs, 1992).

دریاچه طشک از طریق رودخانه کر که نزدیک به پالایشگاه نفت و مجتمع پتروشیمی شیراز می‌باشد آلوده به انواع آلاینده‌های آلی می‌گردد. همچنین به دلیل وسعت اراضی زیر کشت و استفاده فراوان از سموم و حشره‌کشها و ورود آنها به دریاچه توسط باران، آلودگی دریاچه به ترکیبات PAH محرز می‌باشد (جاوید، ۱۳۸۴). هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH از دریاچه طشک و یافتن بهترین غلظت نمک برای تجزیه آنها، توسط باکتری‌های جدا شده می‌باشد.

مواد و روش کار

با توجه به احتمال آلودگی بیشتر ترکیبات PAH در آبهای محدودهٔ مناطق روستایی (ورود پسابهای خانگی و کشاورزی به دریاچه) خط ساحلی سه روستای ده زیر (۱)، طشک (۲) وگمبان (۳) بعنوان ایستگاههای انتخابی تعیین گردید (شکل ۱). زمان نمونه‌گیری اواخر بهار ۱۳۸۴ و بعد از اتمام بارندگی‌های سالانه بود. موقعیت جغرافیایی ایستگاهها توسط دستگاه GPS مشخص شد (جدول ۱).

پس از تعیین ایستگاهها، نمونه‌برداری از آب و رسوب سطحی مناطق مورد نظر انجام گرفت. نمونه‌های آب از عمق ۲۵ سانتیمتری و از عمق ۰/۵ سانتیمتری رسوب بستر دریاچه گرفته شد (از هر ایستگاه ۳ بار). سپس نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای (شسته شده با اسید و استریل) و در محفظه یخ به آزمایشگاه منتقل شده و توسط روشهای میکروبی مورد آنالیز قرار گرفتند.

به منظور آماده‌سازی قبل از کشت، نمونه‌های آب دریاچه به نسبت ۱:۱۰ بوسیله محیط ONR7a مایع و استریل رقیق سازی شدند. همچنین ۱ گرم از هر نمونه رسوب منتقل شده به آزمایشگاه با ۱۰ میلی‌لیتر از محیط ONR7a مایع استریل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه بهم زده شد.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده هم بر روی محیط ONR7a واجد نفتالین و هم بر روی محیط ONR7a دارای آنتراسین بصورت سطحی، کشت داده شد. برای هر نمونه سه بار کشت بر روی هر محیط انجام گرفت. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. برای جلوگیری از تبخیر رطوبت محیط‌ها، اطراف آنها توسط پارافیلم مسدود شد. کلنی‌های ایجاد شده برروی محیط که دارای هاله شفاف بودند به عنوان کلنی‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH محسوب گردیدند. میانگین تعداد کلنی‌های موجود روی سه محیط مربوط به یک نمونه ثبت شد. بعد از پایان مدت گرمخانه‌گذاری و شمارش باکتری‌ها، کلنی‌ها از نظر مورفولوژی، رنگ و اندازه مورد بررسی قرار گرفتند. سپس کلنی‌ها برروی محیط کشت نوترینت آگار خالص‌سازی شدند و مورد آزمایش‌های تعیین هویت از قبیل: رنگ‌آمیزی گرم، بررسی خصوصیات مورفولوژیک، کاتالاز و اکسیداز و سایر آزمایشات تشخیص افتراقی قرار گرفتند (Kasai & Kishira ,2002).

باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH جدا شده طی آزمایش‌های قبلی بعنوان میکروارگانسیم منتخب برای بررسی اثر میزان نمک بر تجزیه PAHها مورد استفاده قرار گرفت. پس از تهیه کشت خالص باکتری، باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد (۹۰ rpm و ۲۵ درجه سانتیگراد) و بعد از ۲۴ ساعت برای بدست آوردن توده سلولی در ۴۵۰۰ دور، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سه بار با محیط کشت ONR7a

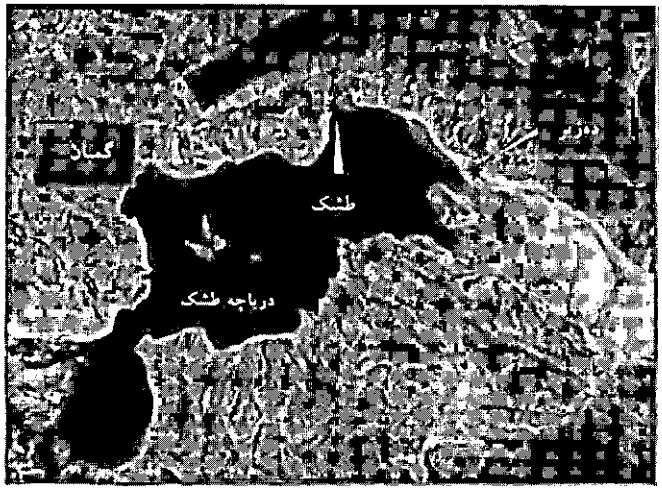
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مایع استریل شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون باکتری بر طبق استاندارد ۰/۵مک فارلند تهیه شده و از آن به صورت ۵ درصد (حجمی – حجمی) بعنوان مایع تلقیح اولیه به محیط‌های کشت استفاده گردید (Diaz & Grigson, 2000).

برای انجام این آزمایش محیط کشت مایع ONR7a با غلظت‌های مختلف نمک NaCl (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲ درصد) به میزان ۱۰۰ میلی لیتر در ارلن‌هایی با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد (از هر کدام دو تا، یکی برای نفتالین و یکی برای آنتراسین). سپس به هر ارلن PAH مربوط به آن (نفتالین یا آنتراسین)، به میزان یک میلیگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید. به هر ارلن سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل اضافه شد. از دو ارلن حاوی محیط کشت و PAH (یکی با نفتالین و یکی با آنتراسین) و بدون تلقیح توسط سوسپانسیون باکتریایی نیز بعنوان شاهد استفاده گردید. سپس تمامی ارلن‌ها در دمای۲۵ درجه سانتیگراد و ۹۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند (Kasai & Kishira, 2002).

اندازه‌گیری جذب در ۴۸۰ نانومتر بصورت روزانه انجام و یادداشت گردید. این کار تا ۱۰ روز پس از تلقیح انجام شد. از ارلن‌های شاهد بدون تلقیح باکتری برای کالیبره‌کردن دستگاه استفاده گردید. برای جلوگیری از هرگونه اختلال و دقیق‌تر شدن اندازه‌گیری جذب، محیط‌هایی که باید جذب آنها اندازه‌گیری شوند، توسط فیلتر استریل شده (باکتری‌ها و مواد جامد معلق آن جدا شدند) و سپس جذب آنها اندازه‌گیری گردید (Sisler & Zobell, 1987).

برای مقایسه ایستگاهها از نظر تفاوت میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH در آب و رسوب از آزمون‌های آنالیز واریانس (ANOVA) و دانکن (Duncan) استفاده گردید. سطح خطای مورد نظر ۵ درصد می‌باشد ($\alpha = ۰/۰۵$). همچنین برای مشخص کردن ارتباط بین میزان تجزیه PAH توسط باکتری با غلظت نمک از آزمون همبستگی (*correlation*) و تعیین r استفاده شد.



شکل ۱ : تصویر ماهواره‌ای محدوده مطالعاتی و موقعیت جغرافیایی ایستگاههای نمونه‌برداری

جدول۱: طول و عرض جغرافیایی ایستگاههای نمونه‌برداری

ایستگاه	موقعیت جغرافیایی	
	طول	عرض
(۱) ده زیر	E ۵۳° ۴۳′	N ۲۹° ۴۶′
(۲) طشک	E ۵۳° ۳۶′	N ۲۹° ۵۰′
(۳) گمبان	E ۵۳° ۲۶′	N ۲۹° ۴۷′

نتایج

در ایستگاه ده‌زیر، میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده نفتالین و آنتراسین در هر میلی‌لیتر آب بترتیب حدود ۲۷ و ۲۳ عدد و در هر گرم رسوب همان ایستگاه ۵۷ و ۴۷ عدد بود.

در ایستگاه طشک میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالین وآنتراسین در نمونه آب بترتیب ۶۷ و ۵۷ عدد و در رسوب بترتیب ۱۲۰ و ۱۱۳ عدد بدست آمد. در ایستگاه گمبان، در نمونه آب بترتیب ۱۲۷ و ۱۱۳ عدد و در رسوب بترتیب ۱۶۳ و ۱۴۷ عدد بود. آزمونهای آماری نشان داد میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH در آب و رسوب هر سه ایستگاه تفاوت معنی‌داری داشت ($P< ۰/۰۵$). بطور کلی با کاهش غلظت نمک و نزدیک‌تر شدن به ورودی رودخانه کر به دریاچه و افزایش احتمالی میزان آلودگی‌های مربوط به ترکیبات PAH، بر تعداد باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH در آب و رسوب افزوده می‌شود (جداول ۲ و۳).

در بررسی میزان تجزیه ترکیبات PAH در طول موج ۴۸۰ نانومتر طی ده روز دوره آزمایش مشخص شد که نفتالین بیشتر از آنتراسین تجزیه می‌شود. میزان تجزیه از غلظت صفر تا ۶ درصد با میزان نمک افزایش یافته و در ۶ درصد به حداکثر خود می‌رسد ($r = +۰/۶۲$) و از ۶ درصد تا ۲۲ درصد با افزایش میزان نمک از میزان تجزیه کم می شود ($r = -۰/۵۲$). در نمونه شاهد با غلظت نمک ۲۵ درصد هیچگونه تجزیه‌ای رخ نمی‌دهد (جدول ۴) . در نمودار ۱ میزان تجزیه در غلظتهای مختلف نمک در روز ششم نشان داده شده است.

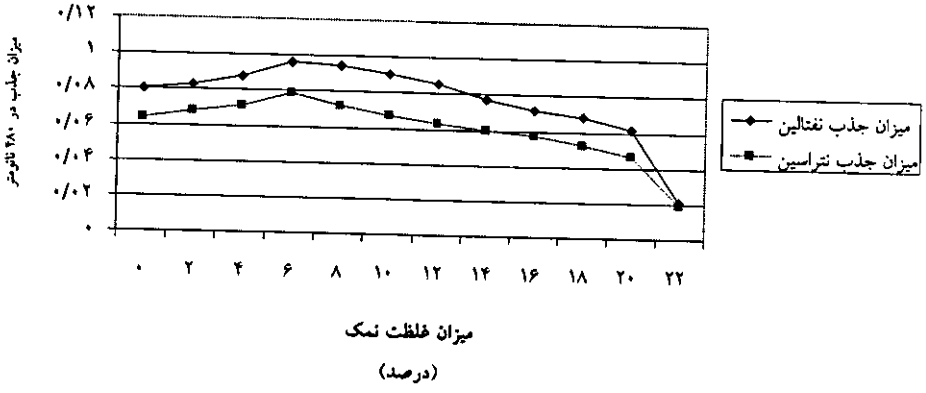
با طولانی شدن زمان، بر میزان مواد حاصل از اکسیداسیون ترکیبات PAH افزوده شده و میزان جذب افزایش می‌یابد و در روز دهم در غلظت ۶ درصد به حداکثر خود در دوره آزمایش می‌رسد (نمودار ۲). براساس آزمایشهای انجام شده کلیه باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH، مربوط به نمونهٔ *Pseudomonas sp.* بودند.

جدول ۲ : جداسازی و شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH در آب دریاچه طشک

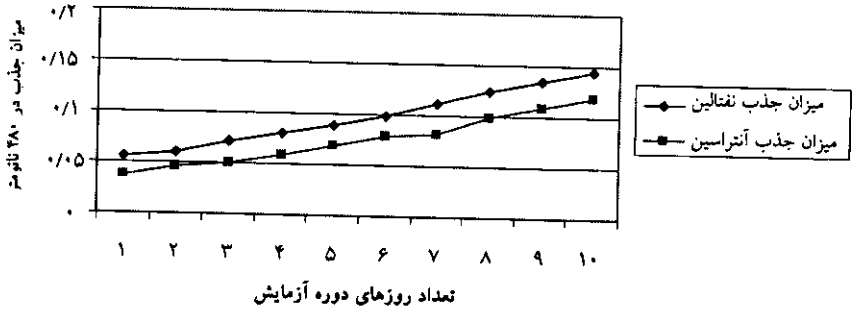
ایستگاه	نمونه	نفتالین		آنتراسین	
		تعداد کلنی	تعداد باکتری درهرمیلی‌لیتر	تعداد کلنی	تعداد باکتری در هرمیلی لیتر
ده زیر (۱)	۱-۱	۲	۲۰	۱	۱۰
	۱-۲	۳	۳۰	۳	۳۰
	۱-۳	۳	۳۰	۳	۳۰
طشک (۲)	۲-۱	۸	۸۰	۷	۷۰
	۲-۲	۷	۷۰	۶	۶۰
	۲-۳	۵	۵۰	۴	۴۰
گمبان (۳)	۳-۱	۱۳	۱۳۰	۱۲	۱۲۰
	۳-۲	۱۵	۱۵۰	۱۳	۱۳۰
	۳-۳	۱۰	۱۰۰	۹	۹۰

جدول ۳ : جداسازی و شمارش باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH در رسوب دریاچه طشک

ایستگاه	نمونه	نفتالین		آنتراسین	
		تعداد کلنی	تعداد باکتری درهرگرم	تعداد کلنی	تعداد باکتری درهرگرم
ده زیر (۱)	۱-۱	۴	۴۰	۳	۳۰
	۱-۲	۷	۷۰	۶	۶۰
	۱-۳	۶	۶۰	۵	۵۰
طشک (۲)	۲-۱	۱۴	۱۴۰	۱۳	۱۳۰
	۲-۲	۱۲	۱۲۰	۱۲	۱۲۰
	۲-۳	۱۰	۱۰۰	۹	۹۰
گمبان (۳)	۳-۱	۱۶	۱۶۰	۱۵	۱۵۰
	۳-۲	۱۸	۱۸۰	۱۶	۱۶۰
	۳-۳	۱۵	۱۵۰	۱۳	۱۳۰



نمودار ۱ : میزان تجزیه PAH توسط *Pseudomonas sp.* در غلظتهای مختلف نمک در روز ششم



نمودار ۲ : میزان تجزیه PAH توسط باکتری *Pseudomonas sp.* در غلظت ۶ درصد نمک طی ده روز دوره آزمایش

جدول ۴ : نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت نمک NaCl در تجزیه ترکیبات PAH توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده

غلظت نمک (درصد)	روز ۱		روز ۲		روز ۳		روز ۴		روز ۵	
	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب
۰	۰/۰۳۰	۰/۰۲۲	۰/۰۳۸	۰/۰۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۳۹	۰/۰۵۶	۰/۰۴۴	۰/۰۶۷	۰/۰۵۲
۲	۰/۰۳۲	۰/۰۲۶	۰/۰۴۲	۰/۰۳۷	۰/۰۵۵	۰/۰۴۲	۰/۰۶۰	۰/۰۴۹	۰/۰۷۱	۰/۰۵۷
۴	۰/۰۴۸	۰/۰۳۱	۰/۰۵۵	۰/۰۴۰	۰/۰۶۶	۰/۰۴۵	۰/۰۷۴	۰/۰۵۱	۰/۰۷۸	۰/۰۶۰
۶	۰/۰۵۶	۰/۰۳۷	۰/۰۶۰	۰/۰۴۶	۰/۰۷۱	۰/۰۵۰	۰/۰۸۰	۰/۰۵۹	۰/۰۸۹	۰/۰۶۸
۸	۰/۰۵۱	۰/۰۳۵	۰/۰۵۸	۰/۰۴۳	۰/۰۶۸	۰/۰۴۷	۰/۰۷۶	۰/۰۵۴	۰/۰۸۱	۰/۰۶۴
۱۰	۰/۰۴۶	۰/۰۳۲	۰/۰۵۴	۰/۰۴۰	۰/۰۶۴	۰/۰۴۵	۰/۰۷۱	۰/۰۵۰	۰/۰۷۸	۰/۰۵۹
۱۲	۰/۰۴۰	۰/۰۳۰	/۰۵۰	۰/۰۳۸	۰/۰۵۸	۰/۰۴۰	۰/۰۶۸	۰/۰۴۶	۰/۰۷۵	۰/۰۵۴
۱۴	۰/۰۳۰	۰/۰۲۶	۰/۰۴۸	۰/۰۳۱	۰/۰۵۴	۰/۰۳۷	۰/۰۶۵	۰/۰۴۲	۰/۰۷۱	۰/۰۵۰
۱۶	۰/۰۲۷	۰/۰۲۳	۰/۰۴۱	۰/۰۲۹	۰/۰۴۹	۰/۰۳۴	۰/۰۵۷	۰/۰۳۹	۰/۰۶۶	۰/۰۴۶
۱۸	۰/۰۲۱	۰/۰۱۴	۰/۰۳۶	۰/۰۲۱	۰/۰۴۱	۰/۰۲۸	۰/۰۵۱	۰/۰۳۱	۰/۰۵۹	۰/۰۴۰
۲۰	۰/۰۱۸	۰/۰۱۱	۰/۰۳۲	۰/۰۱۸	۰/۰۳۸	۰/۰۲۵	۰/۰۴۶	۰/۰۲۹	۰/۰۵۲	۰/۰۳۷
۲۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۱۰	۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۱۱	۰/۰۱۶	۰/۰۱۴	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶

ادامه جدول ۴:

غلظت نمک (درصد)	روز ۶		روز ۷		روز ۸		روز ۹		روز ۱۰	
	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب	نفتالین جذب	آنتراسین جذب
۰	۰/۰۸۰	۰/۰۶۴	۰/۰۸۸	۰/۰۷۰	۰/۰۹۶	۰/۰۸۱	۰/۱۰۸	۰/۰۹۳	۰/۱۱۸	۰/۰۹۸
۲	۰/۰۸۳	۰/۰۶۸	۰/۰۹۲	۰/۰۷۴	۰/۱۱۱	۰/۰۸۹	۰/۱۱۹	۰/۰۹۸	۰/۱۲۷	۰/۱۰۴
۴	۰/۰۸۸	۰/۰۷۱	۰/۰۹۷	۰/۰۷۸	۰/۱۱۷	۰/۰۹۳	۰/۱۲۵	۰/۱۰۱	۰/۱۳۶	۰/۱۱۰
۶	۰/۰۹۸	۰/۰۷۹	۰/۱۱۲	۰/۰۸۲	۰/۱۲۵	۰/۰۹۸	۰/۱۳۴	۰/۱۰۸	۰/۱۴۵	۰/۱۱۹
۸	۰/۰۹۴	۰/۰۷۲	۰/۱۰۲	۰/۰۷۹	۰/۱۲۱	۰/۰۹۰	۰/۱۲۹	۰/۱۰۲	۰/۱۳۳	۰/۱۱۵
۱۰	۰/۰۹۰	۰/۰۶۷	۰/۰۹۸	۰/۰۷۵	۰/۱۱۹	۰/۰۸۶	۰/۱۲۳	۰/۰۹۹	۰/۱۳۰	۰/۱۰۹
۱۲	۰/۰۸۵	۰/۰۶۳	۰/۰۹۲	۰/۰۷۱	۰/۱۱۳	۰/۰۸۱	۰/۱۱۷	۰/۰۹۳	۰/۱۲۸	۰/۱۰۱
۱۴	۰/۰۷۷	۰/۰۶۰	۰/۰۸۹	۰/۰۶۹	۰/۱۰۱	۰/۰۷۸	۰/۱۱۰	۰/۰۹۸	۰/۱۲۰	۰/۰۹۷
۱۶	۰/۰۷۱	۰/۰۵۷	۰/۰۸۲	۰/۰۶۲	۰/۰۹۸	۰/۰۷۲	۰/۱۰۷	۰/۰۸۵	۰/۱۱۶	۰/۰۹۴
۱۸	۰/۰۶۸	۰/۰۵۲	۰/۰۷۶	۰/۰۵۸	۰/۰۹۳	۰/۰۶۶	۰/۱۰۱	۰/۰۷۱	۰/۱۱۱	۰/۰۹۰
۲۰	۰/۰۶۱	۰/۰۴۶	۰/۰۷۰	۰/۰۵۱	۰/۰۸۴	۰/۰۵۹	۰/۰۹۸	۰/۰۶۶	۰/۱۰۹	۰/۰۸۴
۲۲	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹	۰/۰۲۲	۰/۰۲۰	۰/۰۲۳	۰/۰۲۲	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۲۵

بحث

در سطح جهانی اکوسیستم‌های زیادی با غلظت‌های مختلف نمک و آلوده به ترکیبات آلی وجود دارد. بعلاوه سالانه میلیاردها گالن پساب با غلظتهای نمک بالا (w/v ٪۳/۵ <) و با آلودگی‌های آلی توسط صنایع مختلف تولید می‌شود (Diaz & Boyd, 2002). بعنوان مثال، مقدار زیادی پساب آلوده به ترکیبات نفتی طی فرآیندهای تولید، انتقال و پالایش نفت خام وارد محیط می‌شوند. این پسابها می‌توانند مقادیر متفاوتی نمک نیز داشته باشند، که نمک بالا اصلاح زیستی آلودگی‌های نفتی توسط روش‌های موجود را با مشکل روبرو می‌کند. غلظت بالای نمک در بسیاری از این محیط‌ها باعث تخریب غشاء سلولی شده و آنزیمها را تخریب می‌کند. تمامی این شرایط برای میکروارگانیسمهای تجزیه‌کننده کشنده است (Kargi & Dincer, 2000).

ارگانیسمهای هالوفیل یا هالوتولرانت که می‌توانند این شرایط سخت نمکی را تحمل کنند و از نظر فیزیولوژی در این شرایط دارای فعالیت مناسب می‌باشند، برای فرآیند اصلاح زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. Diaz و Grigson در سال ۲۰۰۰ مشخص کردند که تجزیه زیستی نفت خام در شرایطی با غلظت نمک دو برابر نسبت به پسابهای صنعتی، کاهش می‌یابد. با این حال آنها مشخص کردند که حتی در غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر NaCl نیز تجزیه زیستی در حد قابل توجهی انجام می‌گردد.

Ward و Brock در سال ۱۹۷۸ مشخص کردند که متابولیسم هیدروکربن‌ها با افزایش میزان نمک از ۳۳ تا ۲۸۴ گرم در لیتر کاهش می‌یابد. در گزارش دیگر Millet و همکاران در سال ۱۹۹۱، به این نکته اشاره کردند که میزان تجزیه نفت در ابتدا با افزایش غلظت نمک تا ۰/۴ مول در لیتر (۲۳/۳ گرم در لیتر) ، افزایش پیدا می‌کند و پس از آن با بالا رفتن غلظت نمک، کاهش می‌یابد.

برخی باکتری ها قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها در طیف محدودی از نمک می‌باشند. در تحقیقاتی که توسط Bertrand و Almallah در سال ۱۹۹۰ در یک باتلاق نمکی انجام شد ، باکتری های موجود در آب باتلاق قادر بودند در غلظت های نمک کمتر از ۱۰۰ گرم در لیتر هیدروکربن‌ها را تجزیه کنند. در حالیکه باکتری‌های جدا شده از رسوب باتلاق، هم در غیاب نمک و هم در غلظت ۱۱۶ گرم در لیتر نمک قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها بودند.

حلالیت بالاتر نفتالین نسبت به سایر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای دیگر و این حقیقت که آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفتالین توسط پلاسمید کد می‌شوند، تحقیقات در مورد تجزیه بیولوژیک نفتالین را تسهیل کرده است و تاکنون تعداد زیادی باکتری که توانایی تجزیه کردن نفتالین را دارند، شناسایی شده‌اند (Bradesco & Dyhrman, 1998).

در آزمایش‌های انجام شده از نفتالین و آنتراسین بعنوان سوبسترای PAH و تنها منبع کربن و انرژی استفاده گردید. بطور کلی تعداد باکتری‌هایی که قادر به تجزیه نفتالین بودند از تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده آنتراسین بیشتر بدست آمد و میزان این باکتری‌ها در رسوبات دریاچه بالاتر از آب دریاچه بود. از آنجا که نفتالین یک ترکیب آروماتیک دو حلقه‌ای است، نسبت به آنتراسین سه حلقه‌ای راحت‌تر و سریعتر مورد تجزیه باکتری‌ها قرار می‌گیرد. از طرفی به دلیل شرایط آرام دریاچه، کلیه مواد معلق از جمله باکتری‌ها و مواد غذایی رسوب می‌کنند. در مورد ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای نیز باید به این نکته اشاره کرد که این ترکیبات با اتصال به ذرات معلق و رسوب کردن به همراه آنها وارد رسوبات دریاچه می‌شوند و در اختیار باکتری‌ها قرار می‌گیرند.

بر اساس نتایج بدست‌آمده کاملاً مشخص است که تنوع متابولیک یا قابلیت استفاده از سوبسترا و قابلیت تجزیه ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (نفتالین و آنتراسین) با افزایش غلظت نمک از صفر تا ۶ درصد افزایش می‌یابد و در ۶ درصد به اوج خود می‌رسد. این پدیده احتمالاً به علت رشد و فعالیت بهینه باکتری سودوموناس مورد استفاده در این آزمایش در حضور غلظت ۶ درصد نمک و ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای است. با افزایش غلظت نمک از ۶ درصد به بالا از تنوع متابولیک این باکتری کاسته شده و تجزیه سوبسترای هیدروکربنی آروماتیک چند حلقه‌ای کاهش پیدا می‌کند. طبق تحقیقات انجام شده توسط Riis در سال ۲۰۰۴، کاملاً مشخص شده است که میکروارگانیسم‌ها در غلظت‌های بالای نمک ترجیح می‌دهند از سوبستراهایی استفاده کنند که راحت‌تر تجزیه شوند. یا بعبارت دیگر، در حضور سوبستراهایی که به راحتی تجزیه شوند و در اختیار میکروارگانیسم ها قرار گیرند، میکروارگانیسم قادر خواهد بود شرایط سخت را تحمل کند و دقیقاً به همین علت است که میزان تجزیه نفتالین از آنتراسین در غلظت‌های مختلف نمک بیشتر است.

علاوه بر میزان غلظت نمک، عامل زمان نیز در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای دخالت دارد. با افزایش زمان، بر میزان مواد حاصل از تجزیه این ترکیبات افزوده می‌شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری جذب در ۴۸۰ نانومتر حاکی از آن است که در تمام غلظت‌های نمک، میزان تجزیه در روز دهم بیشتر از روزهای دیگر است و این به علت سازگار شدن میکروارگانیسم‌ها با غلظت نمک و افزایش تولید آنزیم‌های لازم برای تجزیه و افزایش میزان رشد و فعالیت باکتری‌ها با گذشت زمان است.

استفاده از این باکتری که بدون هیچگونه دستکاری ژنتیکی قادر به تجزیه آلودگی‌های محیطی می‌باشد، بسیار اقتصادی و مهم است. علاوه بر آن استفاده از فرآیند اصلاح زیستی و پاکسازی محیط به روش بیولوژیک هیچگونه آسیبی برای محیط زیست در بر نخواهد داشت و با استفاده از این روش، شاید بتوان قسمت کوچکی از آسیب‌هایی را که بشر به محیط زیست وارد کرده‌است، جبران نمود.

تشکر و قدردانی

مراتب سپاس و قدردانی خویش را از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند ، به خصوص پرسنل آزمایشگاه اداره کل حفاظت محیط زیست استان فارس، ابراز می‌داریم.

منابع

جاوید، ح. ، ۱۳۸۴. جداسازی باکتری‌های هالوفیل از دریاچه طشک و بررسی اثر آنها در پدیده اصلاح زیستی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم. ۱۲۴ صفحه.

Ashok, B. and Saxena, S. , 1995. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. LETT. Appl. Microbiol. No. 21, pp.246-251.

Atlas, R. and Bortha, R. , 1972. Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal water. Biotechnol. Bioeng. No. 14, pp.297-308.

Bertrand, J. and Almallah, M. , 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophil archaebacterium. LETT. Appl. Micro-biol. No. 11, pp.260-263.

Bradesco, G. and Dyhrman, S. , 1998. Spatial and temporal variation of phenanthrene-degrading bacteria in intertidal sediments. AEM. Vol. 64, No. 7, pp.2560-2565.

Diaz, M. and Boyd, K. , 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. Biotechnology & Bio-engineering. Vol. 79, No. 2, pp.145-153.

Diaz, M. and Grigson, S. , 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. Mar. Biotechnol. No. 2, pp.522-532.

Kargi, F. and Dincer, A. , 2000. Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. Water Environ. Res. No. 72, pp.170-174.

Kasai, Y. and Kishira, H. , 2002. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. AEM. Vol. 68, No. 11, pp.5625-5633.

Koch, J. and Fuchs, G. 1992. Polycyclic aromatic hydrocarbons and effects on life. Eur. J. Biochem. No. 211, pp.649-671.

Millet, G. and Bianchi, M. , 1991. Effect of salinity on petroleum biodegradation. Fresenius J. Anal. Chem. No. 339, pp.788-791.

Pala, D. and Freire, D. , 2002. Bioremediation of clay soil impacted by petroleum. Journal of Engenharia termica. No. 10, pp.29-32.

Pandey, G. and Jain, R. , 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: Role in bioremediation. AEM. Vol. 68, No. 12, pp.5789-5795.

Plotnikova, E.G. and Altyntseva, O.V. , 2001. Bacteria degraders of polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from salt-contaminated soil and bottom sediment in salt mining areas. Microbiology (Moscow). No.70, pp.51-58.

Riis, V. , 2004. Influence of high salinities on degradation of diesel fuel by bacterial consortia. Can. J. Microbiol. No. 49, pp.713-721.

Sisler, F. and Zobell, D. , 1987. Microbial utilization of carcinogenic hydrocarbon. Science. No.106, pp.521-2.

Ward, D. and Brock, T. , 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. Appl. Environ. Microbiol. No. 35, pp.353-359.

Isolation decomposing bacteria of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from Tashk Lake and examination of salt concentration effect on them

Kafilzadeh F.* ; **Javid H. and Mohammadi H.**

Dr.Kafilzadeh@yahoo.com

Biology Dept., Islamic Azad University, Jahrom Branch, P.O.Box :74135/355 Jahrom, Iran

Received: November 2005 Accepted: July 2007

Keywords: Bacteria, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Tashk Lake, Iran

Abstract

Tashk Lake is located in the protected zone of the Bakhtegan Lake in the Fars Province and is a shelter for wildlife. This place is very important environmentally and ecologically. Among entering pollutants to this lake via rivers and side villages, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) compounds are noteworthy which are very harmful to humans and others creatures alike. We used naphthalene and anthracene as the only source of carbon to isolate PAHs degrading bacteria from three predefined stations. We found *Pseudomonas sp.* as the only PAHs degrading bacterium in the water and sediments of the lake. At the station 1 (Dehzir), the mean isolated bacteria acting on naphthalene and anthrecene were 27 and 23 in each ml of water and 57 and 47 in each gram of sediments, respectively. At the station 2 (Tashk), the mean isolated bacteria were 67 and 57 in each ml of water and 120 and 113 in each gram of the sediments which acted on the two carbon sources respectively. At the station 3 (Gomban), the figures were 127 and 113 for water and 163 and 147 for the sediments respectively. We found meaningful differences in the mean number of degrading bacteria in the water and sediments of the three stations ($P<0.05$). The salt concentration for *Pseudomonas sp.* optimum growth and PAHs degradation was found to be around 6% with and increasing rate of degradation over time.

* Corresponding author