

The Effects of pH and NaCl on the Microbial degradation of Naphthalene

Kasra - Kermanshahi, R., Assoc. Prof., Dept. of Biology, Isfahan University

Nouhi, A., Prof., Dept. of Biology, University of Tehran

Assadi, Z., Mcs., Dept. of Biology, University of Tehran

ABSTRACT

With the development of the petroleum industry, there has been an increase in the amount of polyaromatic hydrocarbons such as naphthalene released into the environment. The potential carcinogenic effects of PAHs in the environment and possible health risks to humans are of concern. Because of their genotoxicity, it was recommended as priority pollutants to be monitored in industrial effluents. This interest has led to the development of technologies to contain and detoxify PAH - contaminated wastes.

In this study, the effects of acidic and alkaline conditions and different concentrations of NaCl on biodegradation and solubility rate of naphthalene were determined.

The best growth of bacteria and maximum naphthalene consumption was achieved at $\text{pH} \approx 7$. The rate of degradation was found higher in acidic pH than alkaline pH and it is independent of its solubility.

The growth of *Pseudomonas pseudomallei* was decreased in the mixed medium of naphthalene and NaCl (1.5, and 3,10%).

بررسی اثر pH و غلظتهای مختلف NaCl

بر تجزیه زیستی نفتالین

روحا - کسری کرمانشاهی* اشرف السادات نوحی** زهرا اسدی***

چکیده

نفتالین یکی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای می‌باشد که در پساب صنایعی مثل پالایشگاههای نفت و تولید کک که از درجه حرارت‌های بسیار بالا استفاده می‌کنند وجود دارد و در صورت تخلیه به محیط باعث آلودگی محیط زیست می‌گردد. لذا تصفیه این ماده قبل از تخلیه به همراه پساب بسیار حائز اهمیت می‌باشد. همچنین بررسی عواملی که در تجزیه این ماده مؤثر می‌باشد از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین دلیل در این پژوهش اثر فاکتورهای نظیر pH و NaCl بر تجزیه زیستی این ماده مورد مطالعه قرار گرفته است. در بررسی تأثیر شرایط اسیدی و قلیایی و غلظتهای NaCl بر میزان تجزیه و حلالیت نفتالین، مشخص شد که رشد بهینه باکتریها و مصرف نفتالین در pH=7 است. تجزیه این ماده در pH اسیدی بیش از pH قلیایی و مستقل از میزان حلالیت سوبستراست. رشد باکتری پسودوموناس پسودومالئی در مجاورت نفتالین و NaCl (۱/۵، ۳، ۱۰ درصد) به دلیل عدم دسترسی به مواد محلول کاهش می‌یابد.

مقدمه

تجزیه ترکیبات آروماتیک از یک جهت قسمتی از مسیر معمولی چرخه کربن بوده و از جهت دیگر، وسیله زدایش آلودگی از محیط زیست است [۱۲]. نفتالین یکی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای است که در طبیعت انتشار گسترده‌ای دارد [۸]. تجزیه زیستی این گونه ترکیبات از نظر بیوتکنولوژیک و تولید مواد واسطه خاص در ضمن تجزیه نیز همواره حائز اهمیت بوده است [۱۵]. به همین دلیل عواملی که بر تجزیه زیستی این ماده موثرند نیز بسیار مهم می‌باشند. در این

راستا، شیاریس و همکاران [۱۳] سرعت تغییر و تبدیل نفتالین در رسوبات سطحی یک منطقه آلوده را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که pH بالا در رسوبات دریایی، موجب جذب نفتالین به ذرات شده و بنابراین دسترسی بیولوژیک به آنها آسانتر صورت می‌گیرد. افزایش غلظت نمک نیز در مواردی موجب افزایش سرعت تغییر و تبدیل می‌شود، زیرا به علت

* دانشیار گروه بیولوژی بخش میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان

** استاد گروه بیولوژی بخش میکروبیولوژی دانشگاه تهران

*** کارشناس ارشد گروه بیولوژی بخش میکروبیولوژی دانشگاه تهران

کاهش حلالیت، ذرات جذب رسوبات می‌شوند. وجود گلوکز نیز در این کوسیستم، سرعت معدنی شدن را افزایش داده است [۱۳].

مواد و روشها

روش بررسی غلظتهای مختلف NaCl بر تجزیه نفتالین در فاز آبی:

در این روش از نفتالین به عنوان منبع کربن استفاده شد و به این جهت به ۲۰۰ میلی لیتر از محیط نفتالین + پایه معدنی (NPM) ، مقادیر ۱/۵، ۳ و ۱۰ درصد نمک طعام افزوده شد و پس از تلقیح $10^7 \times 1/8$ باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت، گرما گذاری در ۳۰ درجه سانتیگراد در اتوشیکر دار با دور ۱۲۰ rpm انجام شد. سپس در فواصل زمانی معین به مقدار مورد نظر از محیط آزمایش و شاهد برداشت و پس از گذراندن از صافی معمولی و میلی پور، میزان ماده موجود در هر نمونه با تعیین جذب در طول موج ۲۷۶ نانومتر و با توجه به منحنی‌های استاندارد مربوطه سنجش شد [۱]. تغییرات غلظت نفتالین، همزمان با شاهد بدون باکتری مقایسه شده است.

روش بررسی اثر pH بر تجزیه نفتالین در فاز آبی:

این روش دقیقاً مانند روش بررسی اثر NaCl عمل نموده، با این تفاوت که از pHهای مختلف ۵/۵، ۷ و ۸/۸ استفاده شد و با استفاده از منحنی استاندارد تغییرات غلظت مواد در فاز آبی، در مقایسه با شاهد اندازه گیری شد.

محیطهای کشت

۱- محیط معدنی پایه (MM):^۱

این محیط کشت از دو محلول الف و ب ساخته شده است.

نحوه تهیه هر یک از این محلولها به قرار زیر است:

- تهیه محلول الف: در یک لیتر آب مقطر به میزان ۵/۳۵ گرم Na_2HPO_4 ، ۲/۶۷ گرم NH_4Cl افزوده و حل می‌نمایم.
- تهیه محلول ب: در یک لیتر آب مقطر به طور جدا گانه ۰/۴ گرم $FeSO_4 \cdot H_2O$ ، ۰/۱۵ گرم $MgSO_4 \cdot H_2O$ ، ۱ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و ۰/۱ گرم $CaCl_2 \cdot H_2O$ اضافه نموده و حل

می‌نمایم. سپس به یک لیتر از محلول الف، ۶ میلی لیتر محلول ب افزوده و pH محیط کشت را روی ۷/۱ تنظیم می‌کنیم. بعد از استریلیزاسیون محیط آماده استفاده می‌باشد.

۲- محیط پایه معدنی + نفتالین (NPM):^۲

به یک لیتر از محیط معدنی پایه، محلول نفتالین در دی کلرومتان (۱/۵ گرم نفتالین) اضافه شد.

نتایج

بررسی تأثیر NaCl بر تجزیه نفتالین در فاز آبی محیط کشت:

در این مطالعه از سه غلظت ۱/۵، ۳ و ۱۰ درصد NaCl

استفاده شد. باکتری پسودوموناس پسودومالئی در غلظتهای ۱/۵

و ۳ درصد نمک طعام در مجاورت نفتالین به خوبی رشد

می‌نماید. در مجاورت نمک ۱۰ درصد، باکتری تنها به مدت

۴۸ ساعت ایجاد کدورت نمود. بنابراین از بررسی کمی تغییرات

نفتالین در مجاورت این غلظت از نمک خودداری شد.

کلیه بررسی‌ها با توجه به محیط شاهد (فاقد باکتری) انجام

گرفته است. در محیط حاوی ۱/۵ درصد نمک طعام غلظت

نفتالین محلول در ساعت صفر در محیط تلقیح شده و تلقیح

نشده یکسان است (شکل ۱). پس از آن همزمان با افزایش

میزان انحلال نفتالین در محیط شاهد، کاهش غلظت نفتالین

محلول در کشت تلقیح شده دیده می‌شود. در ۱۲ ساعت اول،

۶/۸ میکروگرم نفتالین وارد یک میلی لیتر از محیط شده در

مقایسه با محیط نرمال ۵۴٪ کاهش حلالیت نشان می‌دهد.

همچنین در همین فاصله زمانی (۱۲ ساعت) باکتری ۵۷٪ نفتالین

موجود در فاز آبی را به مصرف می‌رساند که تقریباً معادل

مصرف نفتالین در محیط نرمال می‌باشد. پس از ۹۶ ساعت،

غلظت نفتالین در محیط تلقیح شده به ۳/۶ میکروگرم در

میلی لیتر می‌رسد.

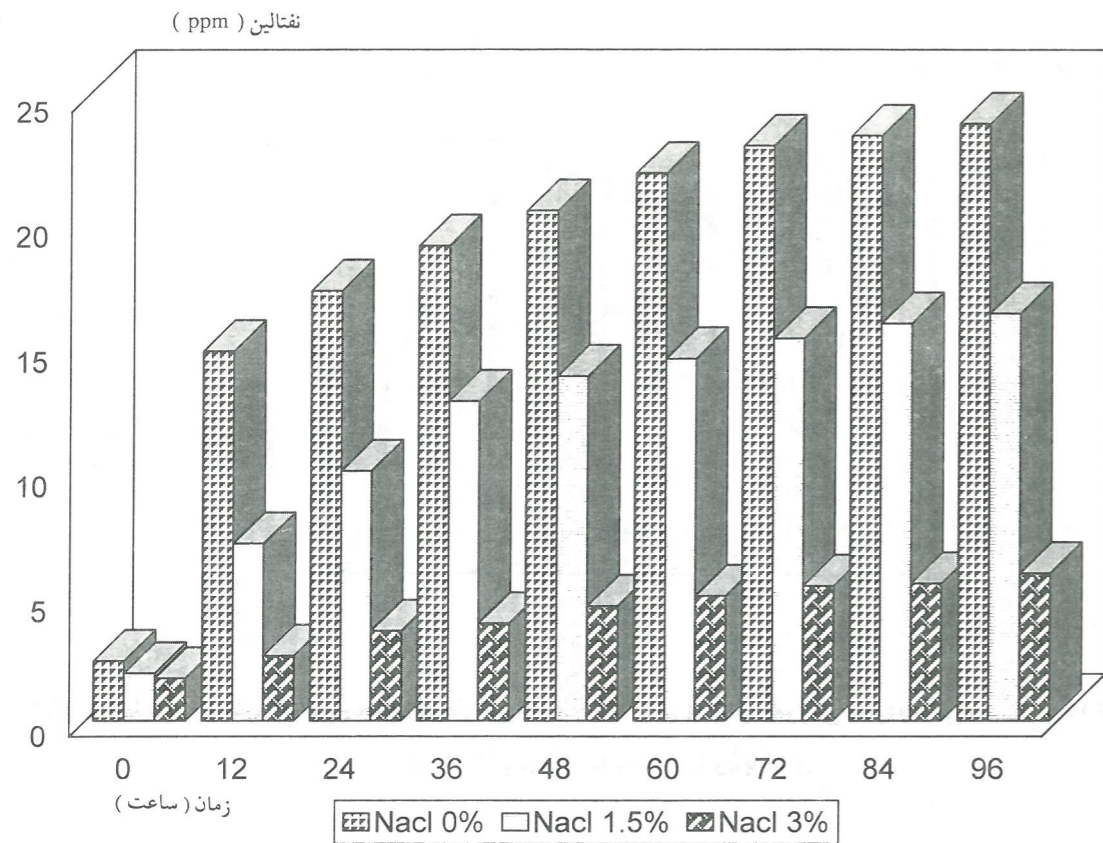
در محیط حاوی ۳ درصد نمک طعام الگوی حلالیت و

مصرف نفتالین مانند محیط نرمال (محیط فاقد نمک طعام) و

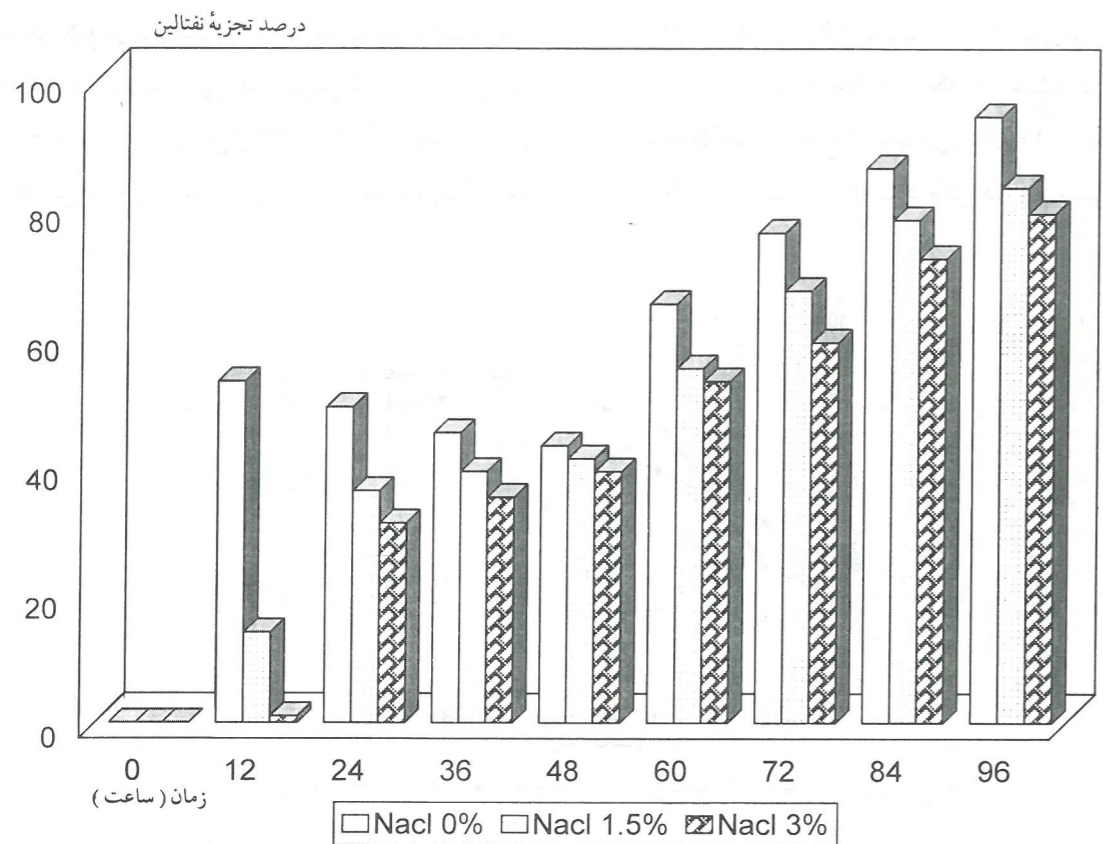
۱/۵ درصد NaCl است (شکل ۲).

1- Mineral Medium

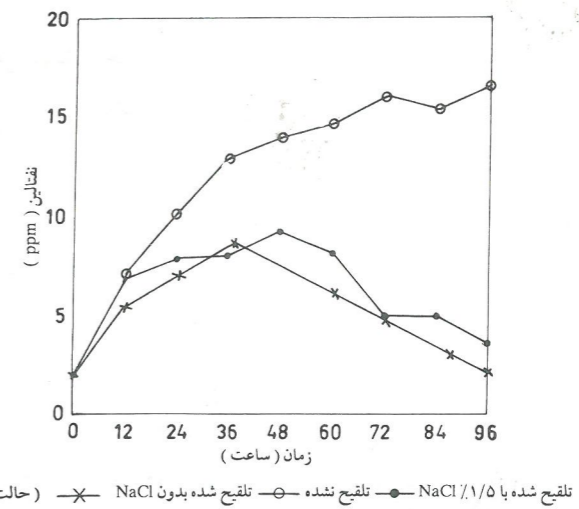
2- Naphthalene Mineral Medium



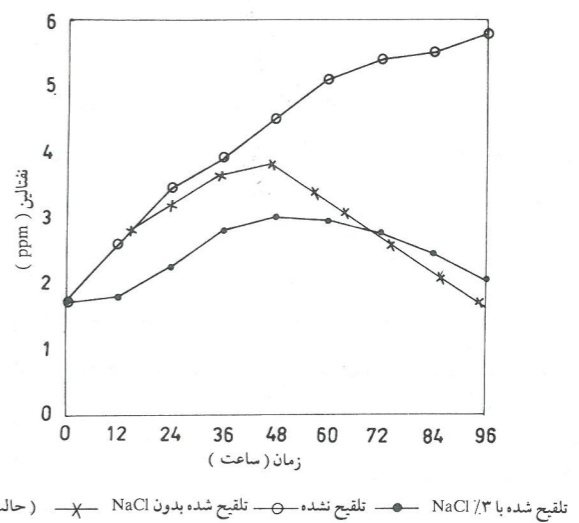
شکل ۳- تأثیر NaCl بر حلالیت نفتالین



شکل ۴- تأثیر NaCl بر تجزیه نفتالین



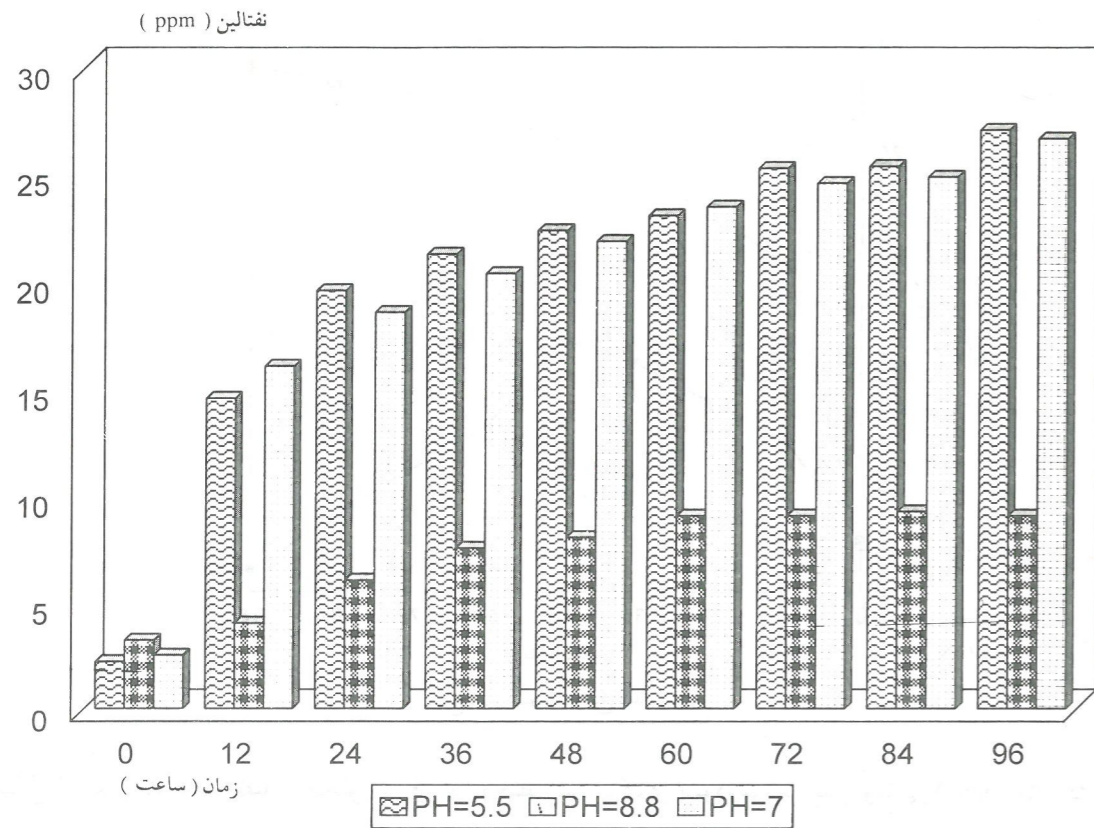
شکل ۱- تغییرات غلظت نفتالین محلول در فاز آبی محیط کشت باکتری پسودوموناس پسودومالٹی (۱۵۰۰ ppm نفتالین) با NaCl ۱/۵ در مقایسه با شاهد بدون باکتری



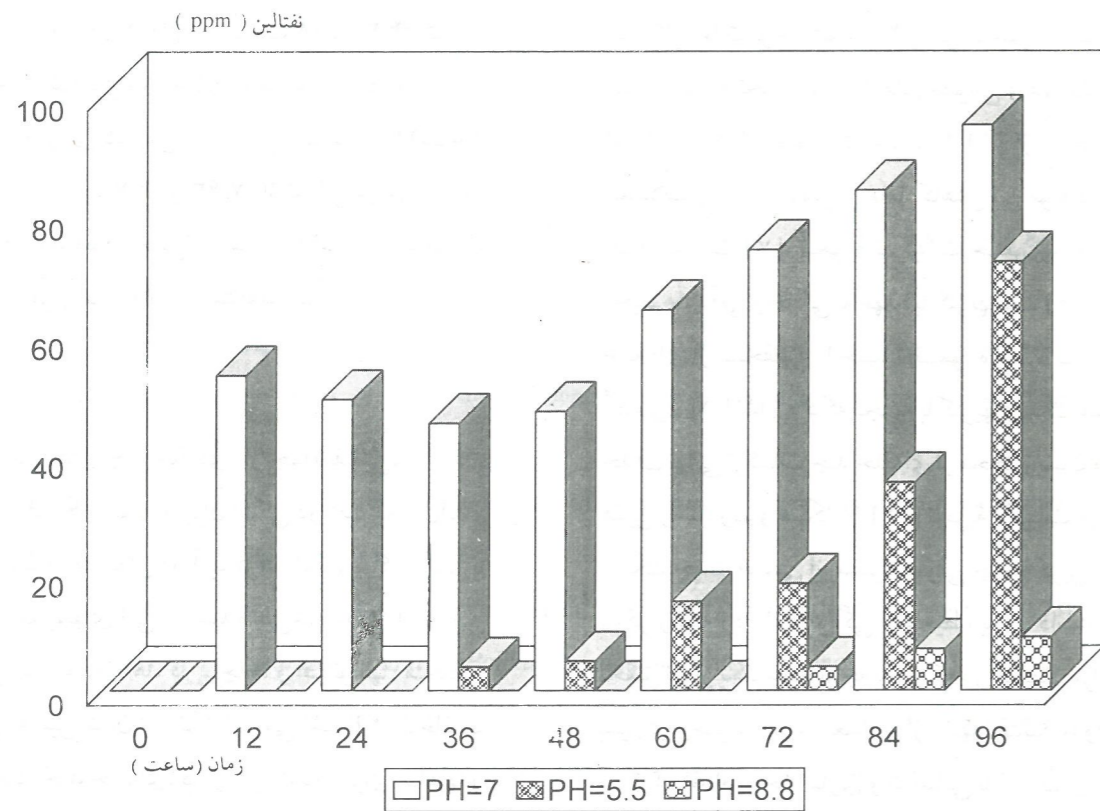
شکل ۲- تغییرات غلظت نفتالین محلول در فاز آبی محیط کشت باکتری پسودوموناس پسودومالٹی (۱۵۰۰ ppm نفتالین) با NaCl ۳ در مقایسه با شاهد بدون باکتری

و تجزیه نفتالین را به صورت ترسیمی نشان می دهند. بررسی اثر pH بر تجزیه نفتالین در فاز آبی محیط کشت تغییرات غلظت نفتالین در فاز آبی محیط کشت باکتری پسودوموناس پسودومالٹی در مقایسه با شاهد بدون باکتری، در سه pH مختلف مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. (شکل های ۵ تا ۹) به نظر می رسد که میزان انحلال نفتالین در pH=۵/۵

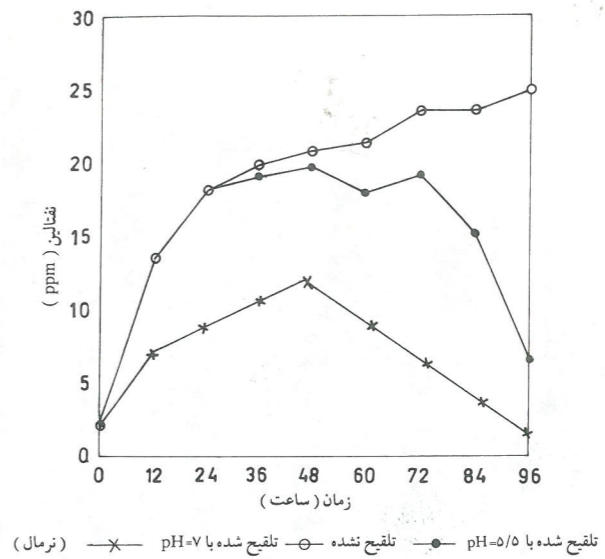
در محیط تلقیح شده، غلظت نفتالین محلول نهایتاً به ۲/۰۴ میکروگرم در میلی لیتر می رسد که نسبت به محیط شاهد (بدون تلقیح) ۶۸/۹ درصد کاهش نشان می دهد. میزان حلالیت نفتالین نیز در ۱۲ ساعت اول، نسبت به محیط نرمال، ۸۲/۴ درصد کاهش داشته است. شکل های ۳ و ۴ تأثیر درصدهای مختلف NaCl بر حلالیت



شکل ۷- تأثیر pH بر حلالیت نفتالین



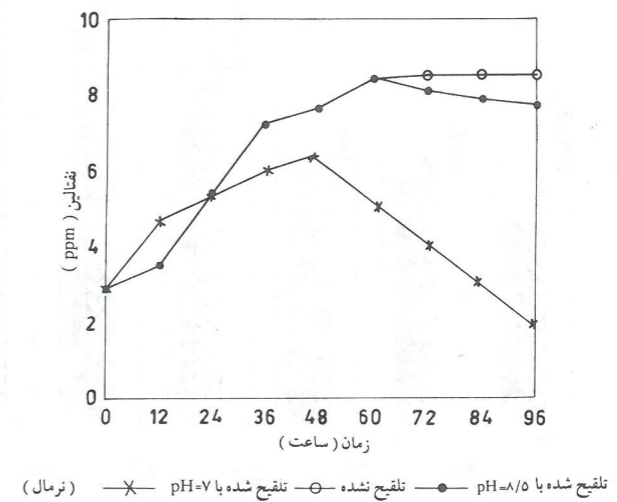
شکل ۸- تأثیر pH بر تجزیه نفتالین



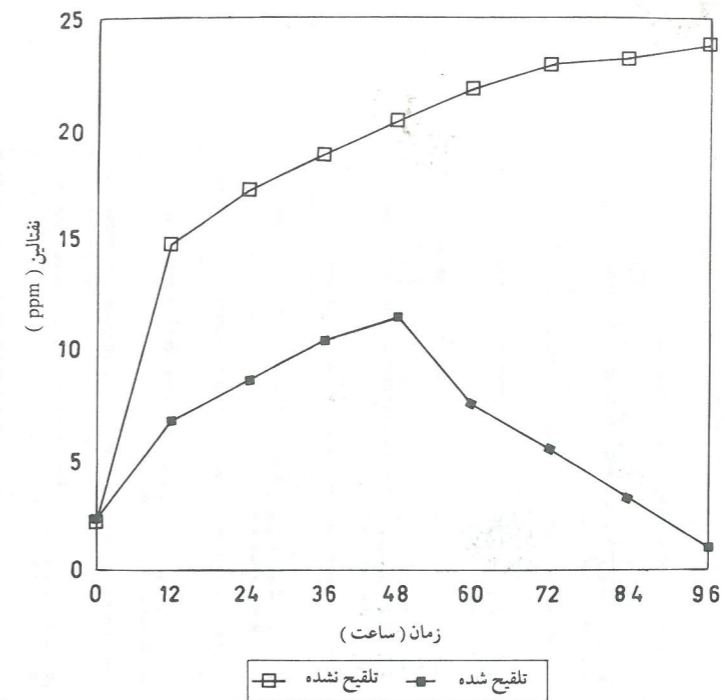
شکل ۵- تغییرات غلظت نفتالین محلول در فاز آبی محیط کشت باکتری پseudomonas پseudomaltii (۱۵۰۰ ppm نفتالین) با pH= ۵/۵ در مقایسه با شاهد بدون باکتری

ساعات ۳۶ و ۴۸ به ترتیب ۳/۹۹٪ و ۵٪ از نفتالین موجود در فاز آبی به مصرف باکتری می‌رسد. با گذشت زمان، مصرف نفتالین افزایش یافته و در ۹۶ ساعت به ۷/۳۷٪ می‌رسد. در شرایط pH=۸/۸ (شکل ۶) غلظت نفتالین در فاز آبی محیط کشت تلقیح نشده، در پایان ۱۲ ساعت به ۳/۵ و در ۹۶ ساعت به ۸/۵۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر رسید که

بیش از pH=۷ محیط نرمال است، به طوری که پس از ۹۶ ساعت، غلظت نفتالین در فاز آبی محیط کشت تلقیح نشده به ۲۴/۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر رسیده که نسبت به شرایط نرمال ۴/۴۸ درصد افزایش نشان می‌دهد (شکل ۵). در این شرایط (pH=۵/۵) رشد باکتری پس از ۳۴ ساعت آغاز گشته و میزان مصرف نفتالین اولیه رشد بسیار پایین است، به طوری که در



شکل ۶- تغییرات غلظت نفتالین محلول در فاز آبی محیط کشت باکتری پseudomonas پseudomaltii (۱۵۰۰ ppm نفتالین) با pH= ۸/۸ در مقایسه با شاهد بدون باکتری



شکل ۹- تغییرات غلظت نفتالین محلول در فاز آبی محیط کشت باکتری پseudomonas پseudomaltii (۱۵۰۰ ppm نفتالین) با pH=۷ در مقایسه با شاهد بدون باکتری

نسبت به محیط نرمال pH=۷ به ترتیب ۷۸٪ و ۶۴/۳٪ کاهش داشت. در چنین شرایطی (pH=۸/۸) رشد باکتری در ابتدا بسیار آرام است، به طوری که پس از ۷۲ و ۸۴ ساعت (۱۲ ساعت پس از رشد) به ترتیب ۴/۷٪ و ۷/۶۳٪ از نفتالین موجود در فاز آبی به مصرف رسید، در حالی که پس از ۹۶ ساعت، مصرف ۹/۲۷٪ نفتالین موجود در فاز آبی مشاهده شد.

بحث

هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای، از جمله نفتالین، به علت خواص هیدروفوبیک خود به میزان اندکی در آب محلول‌اند و به سادگی توسط ذرات معلق در آب گرفته شده و به کمپلکس با مواد آلی، در محیط‌های آبی پوشیده می‌شوند [۱۱]. به این ترتیب، رسوبات رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و اقیانوسها، محیطی مناسب برای ته‌نشین شدن این ترکیبات می‌باشند [۱۲]. غلظت هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای، در رسوبات دریا برای ماهیها و سایر موجودات مصرف‌کننده آنها، از جمله انسان خطرناک است [۵] و وقوع سرطان پوست در میان ماهیهای رودخانه‌هایی که پسابهای صنعتی را دریافت می‌کنند دیده شده است [۴]. به

طور کلی علت توجه عمده به این مواد، سمیت، سرطانی‌زایی و تمایل آنها به تجمع در بافت‌های حیوانی و هم چنین مقاومت نسبت به تجزیه بیولوژیک می‌باشد [۹]. از آنجا که تغییر و تبدیلات زیستی، مهمترین عامل کاهش این مواد در رسوبات و خاک است [۷]، تجزیه ترکیبات حلقوی، در رسوبات و محیط‌های آبی و خاکی به عهده باکتریهاست [۱۰]. این امر نظر عده‌ای از محققین را جلب نموده است. به طوری که گیبسون [۱۲] نشان داد که تجزیه باکتریهای یک مسیر اصلی حذف نهایی ترکیبات چند حلقه‌ای از محیط زیست می‌باشد. در همین راستا، ربم و همکاران [۱۲] تجزیه ترکیبات آروماتیک را از یک جهت قسمتی از مسیر معمولی چرخه کربن و از جهت دیگر وسیله زدایش آلودگی از محیط زیست دانسته‌اند. در این تحقیق نیز از یک سو با توجه به این که در اصفهان مراکز صنعتی بسیاری وجود دارد و تعدادی از آنها نفتالین را وارد محیط می‌کنند، اقدام به جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی این منطقه گردید. یکی از این باکتریها که قادر به مصرف نفتالین هستند، باکتری پseudomonas پseudomaltii می‌باشد. گونه‌های دیگری از این باکتری که قادر به تجزیه زیستی هیدروکربن‌های

چند حلقه‌ای دیگر نظیر فناترن و آنتراسن شده‌اند توسط اوانس و همکاران [۶] از خاک جداسازی شد. از سوی دیگر اطلس [۳] و اسپاین [۱۴] نشان دادند که فاکتورهای متعددی نظیر pH و غلظت نمک در سرعت تجزیه هیدروکربن‌های حلقوی تأثیر می‌گذارند. بنابراین تأثیر این دو فاکتور (شوری و pH) بر تجزیه نفتالین مورد بررسی قرار گرفت و در این آزمایشات کلاً مشخص شد که در مجاورت غلظتهای مختلف نمک (۱/۵٪، ۳٪ و ۱۰٪) باکتری پseudomonas پseudomaltii به خوبی رشد نموده و نمک تأثیری بر روی فیزیولوژی و اعمال باکتری نخواهد گذاشت. این امر کاربرد این باکتری برای تجزیه زیستی نفتالین در محیط‌های آلوده شور را امکان‌پذیر می‌کند. در حالی که شیاریس و همکاران [۱۳] سرعت تغییر و تبدیلات نفتالین در رسوبات چند دریاچه را تحت تأثیر شوری آن منطقه ذکر کرده‌اند، این دانشمندان نشان داد که pH پایین در رسوبات دریایی، موجب کاهش جذب هیدروکربن‌های حلقوی به ذرات شده و فرم بیولوژیک قابل دسترس تری را ایجاد می‌کند. اگرچه در pH اسیدی، نفتالین محلول بیشتری در دسترس باکتری قرار می‌گیرد، لیکن آزمایشات ما در این تحقیق نشان داد که باکتری پseudomonas

منابع و مراجع:

- ۱- کسری کرمانشاهی، ر.، انوحی، ز. اسدی و م. میرمحمدصادقی، "مطالعه تجزیه زیستی نفتالین توسط پseudomonas پseudomaltii با روش میکروبیولوژیکی" مجله علوم پایه دانشگاه اصفهان (جهت بررسی).
- 2- Andelman, J.B., and Suess, M.J. (1970). "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Water Environment", W.H.O., Bull. 43: 479-508.
- 3- Atlas, R.M. (1981). "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environment Perspective", Microbiol. Rev., 45: 180-209.
- 4- Brown, E.R., Hazdra, J.J., Keith, L., Greenspan, F., Kwapinski, J.W., and Beamer. P. (1973). "Frequency of Fish Tumors Found in Polluted Canadian Waters", Cancer Res., 33: 189-198.
- 5- Dipple, A., Cheng, S.C., and Bigger, C.A.H. (1990). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogens", In: M.W. Pariza (ed), mutagens and carcinogens in the diet, Wiley - Liss, New York: 109-127.
- 6- Evans, W.C., Fernley, H.N., and Griffith, E. (1965). "Oxidative Metabolism of Phenanthrene and Anthracene by Soil Pseudomonas", Biochem. J., 95: 819-831.

پseudomaltii در ابتدا دستخوش اختلالاتی شده است زیرا رشد در چنین محیطی پس از ۳۶ ساعت آغاز شده ولی پس از گذشت این مدت با کتری مزبور خود را با شرایط اسیدی تطبیق داده و شروع به مصرف نفتالین نموده است (شکل ۵).

در مجموع در این قسمت تعیین گردید که سرعت و میزان تجزیه نفتالین توسط این باکتری با تغییرات pH، دستخوش تغییرات برگشت‌پذیر می‌شود.

در پایان با توجه به اینکه باکتری پseudomonas پseudomaltii هم‌قادر است در شرایط pH اسیدی و قلیایی و هم با غلظتهای مختلف نمک به رشد خود با مصرف نفتالین به عنوان منبع کربن ادامه دهد، می‌تواند یک میکروارگانیسم بسیار مفید برای تجزیه زیستی نفتالین در شرایط گوناگون محیطی در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌دانیم که از جناب آقای دکتر مجید میرمحمدصادقی به خاطر نظرات سودمندشان در مورد بخش شیمی این تحقیق تشکر و قدردانی نماییم.

- 7- Gibson, D.T. (1971). " *The Microbial Oxidation of Aromatic Hydrocarbons* ", Crit. Rev. Microbiol., 1:199-223.
- 8- Karcher, W.(1988). " *Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds* ", Kumer Academic Publishers, (London) P: 16-30.
- 9- Maccubbin, A.E.P., Black, L., Trezeciak, B., and Black, J.J. (1985). " *Evidence for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Diet of Bottom - Feeding Fish* ", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34:876-882.
- 10- Macgillivray, A.R., and Shiaris, M.P. (1994). " *Relative Role of Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms in Phenanthrene Transformation in Coastal Sediments* ", Appl. Environ. Microbiol., 60: 1154-1159.
- 11- Means, J.C., Hasett, J.J., Wood, S.G., and Banwart, W.L. (1980). " *Sorption Properties of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sediment and Soils* ", Environ. Sci. Technol., 14: 1524-1528.
- 12- Rebm, H.J., and Reed, G.(1986). " *Biodegradation of Aromatic Compounds* ", Biotechnol., 8:477-513.
- 13- Shiaris, M.P. (1989). " *Seasonal Biotransformation of Naphthalene, Phenanthrene, and Benzo(a)Pyrene in Surficial Estuarine Sediments* ", Appl. Environ. Microbiol., 55:1391-1399.
- 14- Spain, J.C., Pritchard, P.H., and Bourquin, A.W. (1980). " *Effects of Adaptation on Biodegradation Rates in Sediment/Water Cores from Estuarine and Freshwater Environment* ", Appl. Microbiol., 40:726-734.
- 15- Windsor, J.G., and Hites, R.A.(1979). " *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Gulf of Marine Sediments and Nova Scotia Soils* ", Geochim. Cosmochim. Acta., 43:27-33.