جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌های بومی از خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی

سمیه اسکندری[1] مهران هودجی[2] آرزو طهمورث‌پور[3] آتوسا عبداللهی[4]

(دریافت ۹۱/۱۱/۱۸ پذیرش ۹۲/۳/۱۵)

چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به‌دلایل مختلفی از جمله احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی در محیط پراکنده می‌شوند. این مواد برای انسان و محیط زیست سمی بوده و اثر سرطان‌زایی دارند. پاکسازی آلودگی‌های هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی انجام می‌شود. روش زیستی که به‌طور معمول شامل تبدیل آلودگی به مواد غیرسمی با استفاده از فرایندهای میکربی است، مؤثرترین و بی‌ضررترین راهکار به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق ابتدا اقدام به غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی از خاک آلوده به این ترکیبات شد و در نهایت، باکتری‌هایی که توانایی رشد و تولید مثل در شرایط حضور هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی را داشتند، به روش PCR شناسایی شدند. نتایج نشان داد که این باکتری‌ها باسیل‌های گرم منفی هستند که با تعیین توالی ژنوم جزء گونه‌هایی از *شوانلا*، *سدوموناس* و *آکروموباکتر* شناسایی شدند. نتایج این تحقیق کارایی باکتری‌ها را برای حذف آلودگی هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی از محیط‌های آلوده تأکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، باکتری بومی، پاکسازی زیستی

Isolation, Purification and Identification of Indigenous Bacteria from PAHs Polluted Soil

S. Eskandary[1] *M. Hoodaji[2]* *A. Tahmourespour[3]* *A. Abdollahi[4]*

(Received Feb. 6, 2013 Accepted May 26, 2013)

Abstract

PAHs are toxic compounds with carcinogenic effects on humans that are released into the environment by incomplete combustion of fossil fuels. Three methods are commonly employed for PAHs pollutant removal: physical, chemical, and biological. From among these, the biological method which typically contains microbial processes and transforms pollutants to nontoxic or less toxic substances is the most innocuous and effective solution. In this study, attempts were initially made to enrich, isolate, and purify indigenous bacteria from PAHs polluted soil. In the second stage, the PCR method was exploited to identify the bacteria that had the capability of growth and reproduction in polluted conditions. It was found that the degrading bacteria are component species of gram negative bacilli determined as *Shewanella, Pseudomonas*, and *Achromobacter*. The results of the present study indicate that the bacteria have the best performance in PAHs removal from polluted environments.

Keywords: PAHs, Indigenos Bacteria, Bioremidiation.

۱- دکترای خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان (نویسنده مسئول) ۳۶۲۶۰۸۶۸ (۰۳۱) eskandary.s@gmail.com
۲- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان
۳- استادیار گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان
٤- استادیار گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان

1. PhD of Soil Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan (Corresponding Author) (+98 31) 36260868 eskandary.s@gmail.com
2. Assoc. Prof. of Soil Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan
3. Assist. Prof. of Basic Medical Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan
4. Assist. Prof., of Chemistry, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan

۱- مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی[1] ترکیبات معطری هستند که دو یا تعداد بیشتری حلقه بنزنی دارند. آنها در طی تخریب دمایی مولکول‌های آلی و ترکیبات مشابه آنها تشکیل می‌شوند [۱ و ۲]. منبع معمول این ترکیبات در محیط می‌تواند فعالیت‌های انسانی، آتش‌سوزی جنگل‌ها و مراتع، نشت نفت، آتشفشان‌ها و صنایع باشد [۳].

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به‌عنوان ترکیبات آلاینده سمّی، جهش‌زا و سرطان‌زا شناخته شده‌اند و احتمالاً این ترکیبات، از اولین سرطان‌زاهای محیطی شناخته شده هستند [۴]. این ترکیبات تحت شرایط طبیعی به‌راحتی از محیط حذف نمی‌شوند و هر چه وزن مولکولی آنها افزایش پیدا می‌کند، مقاومت آنها نیز بیشتر می‌شود. این ترکیبات، به‌دلیل حضورشان در اکوسیستم‌ها، توجه بیشتر محققان محیط زیست را به خود جلب کرده‌اند؛ به‌علاوه این ترکیبات در برابر زیست پالایی مقاومند و پتانسیل تجمع زیستی را نیز دارند. همچنین به‌دلیل حضورشان در هوا، خاک و رسوبات، سرنوشت آنها در محیط بسیار حائز اهمیت است. این ترکیبات ممکن است به یکی از صورت‌های زیر از محیط پالایش شوند: تبخیر، اکسیداسیون نوری، اکسیداسیون شیمیایی، جذب سطحی ذرات خاک و آبشویی [۵].

این روش‌ها معمولاً گران هستند و سبب انتقال آلودگی از یک فاز به فاز دیگر می‌شوند. از بین تمامی روش‌های مطالعه شده، زیست پالایی، فرایندی است که کمترین نیاز را به مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان دارد و سبب تغییر شکل آلاینده از فرم خطرناک به فرم کم خطر یا بی‌خطر می‌شود [۶ و ۷].

اگرچه عوامل محیطی مانند pH، رطوبت، اکسیژن و عناصر غذایی در دسترس، می‌توانند تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند، اما فرایندهای میکربی، سهم بیشتری را در تجزیه این ترکیبات به‌عهده دارند [۸ و ۹].

میکروارگانیسم‌ها از PAHها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و سبب تجزیه و کاهش سمیت آنها می‌شوند زیرا از آنها به‌عنوان یک سوبسترای کومتابولیک استفاده می‌کنند. سرعت و میزان تجزیه، به تعداد حلقه‌های PAH وابسته است؛ PAHهای با تعداد حلقه‌های زیاد و وزن مولکولی بالا، نسبت به تجزیه بسیار مقاومند. امروزه، تعداد زیادی از باکتری‌هایی که توانایی استفاده از انواع PAHها را دارند، جداسازی و شناسایی شده‌اند. تجزیه باکتریایی PAHها، معمولاً از طریق اکسیداسیون اولیه این ترکیبات به کاتکول[2] آغاز می‌شود. باکتری‌ها معمولاً دو مولکول اکسیژن را به یک حلقه بنزنی متصل کرده و از طریق واکنش دی اکسیژناز، یک سیس دی هیدرودیول ایجاد می‌کنند که در نهایت به کاتکول تبدیل می‌شود. زمانی که اولین حلقه آروماتیک هیدروکسیله می‌شود، دومین حلقه نیز مورد حمله قرار گرفته و به همان شکل تجزیه می‌شود. در محیط‌های آلوده، میکروارگانیسم‌های موجود در جمعیت‌هایی با پیچیدگی و تنوع زیاد وجود دارند. عوامل پیچیده‌ای در درک رفتار باکتری در مورد متابولیسم PAHها در محیط مؤثرانند و به‌همین دلیل، معمولاً کمتر از ۱ درصد میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در محیط آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی رشد کنند. وسعت و سرعت زیست پالایی به اسیدیته، دما، اکسیژن، جمعیت میکربی، درصد تجمع، در دسترس بودن عناصر غذایی، ساختار و ترکیب شیمیایی، خصوصیت سلولی و مقدار مواد غذایی در محیط وابسته است [۱۰].

آیتکن و همکاران، یازده گونه باکتریایی از مکان‌های آلوده مختلف (نفت و گازوئیل)، جداسازی کردند که توانایی تجزیه برخی از هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی را دارا بودند. این گونه‌ها عبارت بودند از: *سدوموناس‌ها*، *آگروباکتریوم‌ها*، *باسیلوس‌ها* و *اسفنگوموناس‌ها* [۱۱].

هدف از این تحقیق جداسازی، خالص سازی و در نهایت شناسایی گونه‌های باکتریایی از خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به روش PCR بود.

۲- مواد و روش‌ها

از آنجا که آلودگی هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در پالایشگاه‌های نفت زیاد و آلوده شدن خاک به این ترکیبات در این مناطق اجتناب ناپذیر است، لذا خاک مورد مطالعه در این تحقیق از منطقه پالایشگاه اصفهان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تهیه عصاره اشباع، اسیدیته خاک به‌وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلول‌های بافر، اندازه‌گیری شد. هدایت الکتریکی عصاره اشباع توسط دستگاه هدایت‌سنج متر-اهم، تعیین شد [۱۲].

برای اندازه‌گیری غلظت PAHها در نمونه خاک، ابتدا ۱۰ گرم نمونه خاک عبور داده شده از الک ۲ میلی‌متری با ۱۰ گرم Na_2SO_4 به‌وسیله سوکسله با ۱۵۰ میلی‌لیتر استون و دی‌کلرومتان (۱:۱) عصاره‌گیری شد و پس از روتاری و کاهش حجم، نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر نرمال هگزان به دستگاه GC-FID مدل اجیلنت[3] A۷۸۹۰ تزریق شدند [۱۳].

[1] Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs)

[2] Catechol

[3] Agilent

دمای ورودی به دستگاه کروماتوگرافی گازی ۲۶۰ درجه سلسیوس، دمای دتکتور ۲۷۰ درجه سلسیوس و جریان گاز حامل ازت ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. افزایش دما از ۷۰ درجه سلسیوس شروع شد و با شیب ۵ درجه سلسیوس در دقیقه به ۲۹۰ درجه سلسیوس افزایش یافت.

به‌منظور بررسی حضور باکتری‌های هتروتروف در خاک آلوده، اقدام به کشت رقت‌هایی از نمونه یک گرمی خاک در محیط کشت نوترینت آگار شد و پس از ۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی‌های تک، شمارش شدند [۱۴].

برای غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده PAH ها، از لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت نمکی استفاده شد؛ به این صورت که، به یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه نمکی، یک گرم خاک اضافه شد و برای مدت یک هفته بر روی انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباسیون شد.

محیط کشت پایه نمکی حاوی ۵۳۵۰ میلی گرم Na_2HPO_4، ۲۶۷۰ میلی‌گرم NH_4Cl، ۰/۶ میلی‌گرم $CaCl_2.H_2O$، ۶ میلی‌گرم $MgSO_4$، ۲/۴میلی‌گرم $FeSO_4.H_2O$ و ۰/۰۹ میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$ و ۱۲/۸ میلی‌گرم در لیتر هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی شامل: نفتالن، اسنفتن، اسنفتیلن، فلورن، فنانترن، آنتراسن، فلورانتن، پیرن، بنزوآآنتراسن، کریزن، بنزو بی فلورانتن، بنزو کی فلورانتن، بنزوآ پیرن، بنزو جی اچ آی پریلن، دی بنزو آ اچ آنتراسن و ایندنو در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود. محیط کشت جامد حاوی ۲۰ گرم در لیتر آگار در محیط پایه تهیه شد.

پس از گذشت یک هفته که کدورت در لوله‌ها مشاهده شد، یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به محیط کشت‌های جدید پایه نمکی حاوی PAH ها تزریق شد. این مرحله حداقل سه مرتبه قبل از جداسازی باکتری‌ها تکرار شد [۱۴].

به‌منظور شمارش باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، از لوله‌های حاوی محیط کشت و باکتری که کدورت در آنها مشاهده می‌شد، رقت‌های مختلف به نسبت ۱:۱۰ تهیه و سپس بر روی محیط کشت جامد حاوی هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی کشت داده می‌شد و پس از ۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، کلنی‌های تک شمارش می‌شد. در نهایت درصد باکتری‌هایی که توانایی استفاده از هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی محیط را داشتند با توجه به تعداد کل باکتری‌های هتروتروف محاسبه شد [۱۵].

به‌منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، از کلنی‌های تک تشکیل شده بر روی محیط کشت جامد پایه نمکی که حاوی غلظت ۱۲/۸ میلی‌گرم در لیتر از این ترکیبات بود، استفاده شد و کلنی‌هایی که دارای شکل و مورفولوژی متفاوتی بودند، انتخاب و به لوله‌های حاوی محیط کشت مایع پایه نمکی منتقل شدند [۱۶].

برای شناسایی باکتری‌های جداسازی شده که توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها از محیط را دارند، پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باکتری‌ها توسط میکروسکوپ نوری ابتدا اقدام به شناسایی جدایه برتر از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله آزمون اکسیداز، کاتالاز، تخمیر لاکتوز، گلوکز، سوکروز و رشد در محیط بی هوازی شد [۱۷]. سپس گونه باکتری به‌وسیله روش PCR با استفاده از پرایمر همگانی 16S rDNA شناسایی شد. در این روش ابتدا DNA باکتری مقاوم به‌وسیله کیت استخراج DNA محصول شرکت سینا ژن، استخراج شد، سپس حدود ۱۵۸۰ باز در محدوده ژن 16S rDNA به‌وسیله پرایمر جهانی

F_{27}(5-AGCGGTCCAGAGTTTTCCTGG-3) و R_{1492}(5-CTCTCTGCAGCCCTTGTTACG-3) تعیین و اقدام به انجام PCR شد؛ به این صورت که ابتدا یک محلول مادر با غلظت‌های: PCR Buffer 10 X (۱۰۰ میکرولیتر)، $MgCl_2$ 50mM (۴۰ میکرولیتر)، dNTP mix 10mM (۲۰ میکرولیتر) و آب مقطر تزریقی (۸۴۰ میکرولیتر) تهیه شد و مقدار ۲۱ میکرولیتر از این محلول با ۲ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم اسمارتک پلیمراز در میکروتیوپ‌های ۰/۵ میلی لیتری مخصوص PCR مخلوط شد و در دستگاه قرار داده شد. برنامه دمایی دستگاه به‌صورت: جداسازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، جداسازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته تک DNA در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه، پیشروی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، به‌صورت ۳۰ سیکل و در نهایت تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه تنظیم شد [۱۸].

به‌منظور بررسی رفتار باکتری در حضور PAH ها و روند رشد آنها در شرایط آزمایشگاهی، یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری‌های خالص سازی شده که کدورت آن برابر استاندارد نیم مک فارلند بود، به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جدید که غلظت ۱۲/۸ میلی‌گرم از ۱۶ هیدروکربن ذکر شده را داشت، تلقیح شد. در هر میلی‌لیتر از کدورت نیم مک فارلند تعداد $۱/۵\times۱۰^{۷}$ باکتری حضور دارد. در این شرایط در حقیقت تنها منبع کربن برای باکتری‌ها، PAH ها هستند و رشد در این شرایط نشان دهنده استفاده باکتری از این ترکیبات است. سپس در طی مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، روند رشد باکتری به‌وسیله کدورت سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر

اندازه‌گیری شد [۱۴].

روش آماری در این تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری اکسل و محاسبه خطای استاندارد صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

پس از انتقال خاک آلوده به محل گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، مقداری از این خاک هوا خشک شد و از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن و همچنین مقدار هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی برای بررسی شرایط بهینه جهت حضور باکتری‌ها اندازه‌گیری شد که نتایج این اندازه‌گیری‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج این جدول نشان می‌دهد که خاک مورد مطالعه از لحاظ اسیدیته و شوری دارای هیچ‌گونه محدودیتی برای رشد و تولید مثل میکروارگانیسم‌ها نیست.

غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در این خاک بسیار زیاد و حتی چندین برابر استانداردهای جهانی برای حضور این ترکیبات در خاک است. آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا[1] غلظت این ترکیبات را در خاک، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعیین کرده است [۱۹].

نتایج مربوط به شمارش کلنی‌های مجزای تشکیل شده به‌وسیله باکتری‌های هتروتروف، بر روی محیط کشت نوترینت آگار و همچنین کلنی‌های تک تشکیل شده بر روی محیط کشت پایه نمکی جامد حاوی ۱۲/۸ میلی‌گرم در لیتر از هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، نشان داد که تقریباً ۱۳/۳ درصد از کل باکتری‌های هتروتروف دارای قدرت تجزیه‌کنندگی هیدروکربن‌ها هستند. پس از جداسازی، جدایه‌ها اقدام به شناسایی آنها به‌وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی در حد جنس و سپس شناسایی این جدایه‌ها در حد گونه از طریق روش PCR شد. نتایج این بخش از تحقیق در جدول ۲ ارائه شده است.

[1] U.S. Envronmental Protection Agency (USEPA)

جدول ۱- اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده

خصوصیت	مقدار	خصوصیت	مقدار
اسیدیته	۷/۲۴	نفتالن (mg/kg)	۳۲±۵
هدایت الکتریکی (dS/m)	۳/۴	اسنفتن(mg/kg)	۳۷±۹
تعداد باکتری های هتروتروف (CFU/g)	۳×۱۰^{۶}	اسنفتیلن(mg/kg)	۴۴±۵
تعداد باکتری های تجزیه کننده (CFU/g)	۴×۱۰^{۵}	انتراسن(mg/kg)	۷±۲
بنزو ا انتراسن(mg/kg)	۳۱±۴	فنانترن(mg/kg)	۱۰±۵
بنزو ا پیرن(mg/kg)	۶±۲	کریسن(mg/kg)	۶۴±۱۱
بنزو ای اچ جی پریلن(mg/kg)	۷±۶/۵	دی بنزو ای اچ انتراسن(mg/kg)	۸±۴

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی جدایه‌های انتخابی

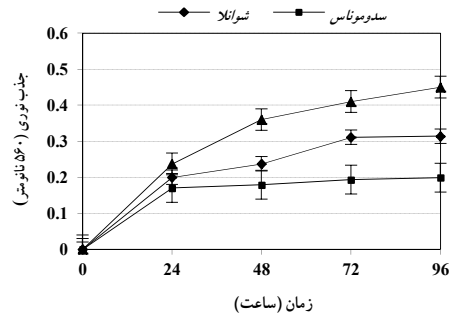
آزمون / جدایه	۲	۴	۶
شکل	Rods	Rods	Rods
واکنش گرم	-	-	-
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
اسید از گلوکز	-	+	–
سیترات	-	+	+
حرکت	+	+	+
تولید ایندول	-	-	+/-
اسید از لاکتوز	+	-	-
اوره	-	–	+
رشد بیهوازی	+	-	-
اسید از ساکارز	-	-	-
اسید از مانیتول	-	+	-
احیاء نیترات	+	+	+
حداکثر دمای رشد (درجه سلسیوس)	۵۰	۵۰	۵۰
رشد در ۳۰ درجه سلسیوس	+	+	+
اکسیداتیو /فرمنتاتیو	nd	O+/F-	nd
تولید H_2S	-	-	-
نتیجه شناسایی	*شوانلا*	*سدوموناس*	*اکروموباکتر*

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده نشان داد که، این باکتری‌ها به‌ترتیب از جنس‌های *شوانلا*، *سدوموناس* و *اکروموباکتر* هستند. شناسایی این باکتری‌ها در حد گونه، به‌وسیله روش PCR در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج شناسایی PCR و ثبت سه گونه باکتریایی به عنوان گونه‌های جدید در بانک جهانی ژن سایت NCBI

جدایه	جنس و گونه	شماره دسترسی
جدایه ۲	*شوانلا پوتریفیشنس* ATHE11	KC329472.1
جدایه ۴	*سدوموناس آئروژینوزا* ATHE12	KC329473.1
جدایه ۶	*آکروموباکتر اینزولیتوس* ATHE14	KC469988.1

برای بررسی رفتار باکتری در شرایط حضور هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، منحنی رشد باکتری شناسایی شده، رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی رشد جدایه‌ها در حضور هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی

از آنجا که هیچ منبع کربنی دیگری به جز هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در محیط وجود ندارد، نمودار رشد باکتری‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها می‌توانند به‌راحتی در حضور ۱۲/۸ میلی‌گرم در لیتر هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی رشد کرده و از این ترکیبات استفاده کنند و به فاز سکون برسند.

باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن، اولین بار حدود یک قرن قبل جداسازی شدند. امروزه حدود ۷۹ جنس از باکتری‌ها شناسایی شده‌اند که توانایی استفاده از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به‌عنوان منبع کربن و انرژی را دارند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به جنس‌های *آلکانیووراکس*[1] و *سدوموناس* اشاره کرد. نکته‌ای که باید مورد توجه قرار گیرد این است که این میکروارگانیسم‌ها تنها اجزای فرایند زیست‌پالایی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای نیستند بلکه بخشی از یک شبکه اکولوژیکی هستند که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با سایر اجزای محیط در ارتباط هستند. در واقع عواملی مثل رقابت برای مواد غذایی محدود کننده، شکار شدن توسط پروتوزآ، لیز شدن به‌وسیله فاژها و برهمکنش‌های اشتراکی که سبب افزایش تجزیه زیستی می‌شود، بر فعالیت این میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارند [۲۰].

یی و همکاران، در تحقیقی باکتری *اسفنگوموناس*[2] را جداسازی کردند که قادر بود غلظت بنزو آ پیرن را در طی مدت زمان ۱۶۳ ساعت انکوباسیون به ۵ درصد برساند. همچنین آنها مشاهده کردند که سلول‌های این باکتری در این شرایط به راحتی می‌توانند رشد و تولید مثل کنند [۲۱].

رومرو و همکاران، در مطالعه‌ای *سدومونای آئروجینوس*[3] را از رودخانه آلوده به نفت جداسازی کردند. این گونه توانایی رشد برروی غلظت‌های بالای فنانترن را دارد و در طی مدت زمان ۳۰ روز کاملاً این ماده را از محیط حذف نموده است [۲۲].

یوآن و همکاران، شش گونه از باکتری‌های گرم منفی را از زباله‌های پتروشیمی دفن شده جداسازی کردند که توانایی تجزیه آسنفتیلن، فلورن، فتانترن، آنتراسن و پیرن را به میزان ۷۰ تا ۱۰۰ درصد در طی مدت زمان ۴۰ روز داشتند. دو جدایه از ۴ جدایه، *سدوموناس فلورسنس*[4] و *هائموفیلوس* بودند که جزء کوکوباسیل‌های گرم منفی هستند [۲۳].

دین رز و همکاران، دو جدایه باکتریای *ردوکوکوس*[5] و *مایکوباکتریوم*[6] را از رسوبات رودخانه جدا کردند که هر دو باکتری توانایی تجزیه PAHها را داشتند [۲۴].

رودوتورولا[7] و *سدوموناس آئروجینوس*[8]، از میکروارگانیسم‌هایی بودند که در مطالعه دیگری بر روی فنانترن از آنها استفاده شد. سلول‌های این میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت پایه معدنی مایع تلقیح شد و مشاهده شد که تقریباً تمام فنانترن موجود در محیط در طی مدت زمان یک ماه توسط هر یک از دو جدایه حذف شد. البته مشاهده شد که *رودوتورولا* بسیار فعال‌تر از *سدوموناس* است. تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک، همبستگی مستقیم با چگالی میکربی و بیومس دارد و با افزایش بیومس افزایش پیدا می‌کند [۱۰].

بیشتر گونه‌های مایکوباکتریوم که از محیط‌های آلوده به PAH جداسازی شدند، توانایی زیادی در متابولیسم PAHهایی با وزن

[1] *Alcanivorax*

[2] *Sphingomonas paucimobilis strain EPA 505*
[3] *Pseudomanas aeroginosa*
[4] *Pseudomonas Flouresens*
[5] *Rhodococcus spp.*
[6] *Mycobacterium*
[7] *Rhodotorula glutinis*
[8] *Pseudomonas aerogenosa*

مولکولی بالا مانند پیرن و بنزو آ پیرن در محیط کشت دارند.

جمعیت‌های میکربی که توانایی تجزیه نفتالن را دارند، بیشتر جزء گونه‌هایی از *سدوموناس* هستند، در حالی که جمعیت‌های تجزیه کننده فنانترن بیشتر جزء گونه‌هایی از *اسیدووراکس*[1] هستند.

جدایه‌هایی که در این تحقیق جداسازی و بررسی شدند، عبارت‌اند از *شوانلا*، *سدوموناس* و *اکروموباکتر* که این باکتری‌ها نیز در تحقیقات دیگری که بر روی هیدروکربن‌ها صورت گرفته است، جداسازی و بررسی شدند. از جمله در تحقیقی که توسط جنتیل و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفته است، باکتری شوانلا که از آب دریا جداسازی و شناسایی شده بود، توانایی حذف ۲۰ تا ۵۰ درصد از نفت خام در شرایط آزمایشگاه را داشت [۲۵].

در تحقیق مشابهی که بر روی باکتری‌های جداسازی شده از خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در قطر صورت گرفته نیز، باکتری *سدوموناس* و *آکروموباکتر* جداسازی شدند که توانایی رشد بر روی ۱۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از هیدروکربن‌های آروماتیک فنانترن، آنتراسن و نفتالن را داشتند. در این تحقیق نیز روند رشد باکتری‌ها در شرایط حضور هیدروکربن بررسی و با شرایط عدم حضور هیدروکربن در محیط مقایسه شد [۲۶].

[1] *Acidovorax*

۴- نتیجه‌گیری

حضور هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در محیط می‌تواند حیات موجودات زنده و به‌خصوص انسان را به خطر بیندازد، لذا حذف این ترکیبات از محیط بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق با جداسازی و شناسایی گونه‌های باکتریایی که توانایی رشد و تولید مثل در شرایط آلودگی به این ترکیبات را داشتند، گام مهمی در جهت حذف این ترکیبات از سایت‌های آلوده برداشته شد. در تحقیقات دیگری که به موازات همین تحقیق صورت گرفت، باکتری‌های دیگری شناسایی و روند حذف این ترکیبات به‌وسیله کروماتوگرافی گازی یون انتخابی انجام شد.

۵- مراجع

1. Nie, M., Xiao, Z., Jin, W., and Chang, F. (2009). "Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization." *J. Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2535-2542.
2. Carsten Suhr, J. (1997). "Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) in 2,4-D contaminated soil." *J. Plant and Soil*, 189, 139-144.
3. Kaksonen1, A.H., Jussila, M.M., Lindstro¨m, K., and Suominen, L. (2006). "Rhizosphere effect of Galega Orientalis in oil-contaminated soil." *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 817-827.
4. Johnsona, D.L., Andersonb, D.R., and McGratha, S.P. (2005). "Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil." *J. Soil Biology and Biochemistry*, 37, 2334-2336.
5. Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., and Lester, J.N. (1991). "A review of atmospheric poly cyclic aromatic hydocarbonse: Sources , fate and behavior." *Water Air Soil pollut*., 60, 279-300.
6. Niel, O.P. (1995). *Environment chemistry*, 2nd Ed., Chapman and Hall London SE1 8HN, UK, p237.
7. World Health Organization. (1998). *Selected non heterocyclic poly cyclic aromatic hydrocarbons environmental health criteria 202 International program on chemical safty WHO,* Geneva.
8. US.EPA. (1997). *Code of federal regulation title 40 part 60 subparts D Da Db Dc,* Environmental Protection Agency Washington DC. 44.
9. Yu, H., and Xue, Y. Y. (2009). "Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil." *Science the Total Environment*, 407, 1027-1034.
10. Haritash, A.K., and Kaushid, C.P. (2009). "Biodegradation aspects of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)." *J. of Hazardous Materials*, 169, 1-15.
11. Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C., and Chen, S.H. (1998). "Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons." *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 743-752.

12. Rhoades, J. D. (1986). “Cation exchange capacity.” Page, A. C. (Ed). *Methods of soil analysis*, part. 2, American Society Agronomy, 9.
13. Rodrigo, S., Okeke, C., Peralba, M., and Camargo, O. (2009). “Smproved enrichment and iohtion of polycyclic aromatic hydrocerbos PAH-degrading microorgomisn in soil using Anhracene as arnodel PAH. *Curr. Microbiology*, 58, 628-634.
14. Sang-Hwan Lee, A., Won-Seok Lee, B., Chang-Ho Lee, C., and Jeong-Gyu, K. (2008). “Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes.” *J. of Hazardous Materials*, 153 892-898.
15. Neuman, G., Teras, R., Monson, L., Kivisaar, M., Schauer, F., and Heipieper, J. (2004). “Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Effects of toxicity and adaptation.” *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 70, 1907-1912.
16. Eskandary, S., Tahmourespour, A., and Hoodaji, M. (2011). “Investigation of growth and removal of phenol by isolation of bacterium from industrial waste water in vitro.” *J. Water and Wastewater,* 78, 78-85. (In Persian)
17. Holt, G., Krieg R., Sneath, A., Staley, T., and Williams, T. (1994). *Bergeys manual of d eterminative bacteriology*, 9 th Ed., Williams and Wilkins Publisher, Baltimor.
18. Mcpherson, M.J., and Muller, S.G. (2000). *PCR*, Bios Scientific Publisher, New York, Oxford.
19. United State Environmenal Protection Agency. (2008). *Poly cyclic aromatic hydrocarbonse*, USEPA.
20. Johnsona, D.L., Andersonb, D.R., and McGratha, S.P. (2005). “Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil.” *J. Soil Biology and Biochemistry*, 37, 2334-2336.
21. Ye, D., Akmail Siddiqi, M., Maccubbin, A., Kumar, S., and Sikra, H. (1996). “Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by sphingomonas paucimobilis.” *Environmental Science and Technology*, 30, 136-142.
22. Romero, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S., and Arambarri, A.M. (1998). “Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream.” *Environmental Pollution*, 101, 355-359.
23. Yuan, S.Y., Chang, S.W., and Chang B.V. (2003) “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 625-632.
24. Dean-Ross.” D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., and Cerniglia, C.E. (2001). “Metabolism of anthracene by a rhodococcus species FEMS.” *Microbiology Letters*, 204, 205-211.
25. Gentile, G., Bonasera, V., Amico, C., Giuliano, L., and Yakimov, M.M. (2003) “Shewanella sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids.” *J. Appl. Microbiol*, 95, 1124-1133.
26. Roda, F., Desouky, A. M., and Al-Shammri, M. (2009). “Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils.” *African Journal of Microbiology Research*, 3(11), 761-766.