مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۵ شماره ۳ پاییز ۱۳۸٦ , صفحات : ۷۷- ٦۷

جدا سازی باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH) از دریاچه مهارلو و بررسی اثر غلظت نمک در تجزیه آن ها

دکتر حمید محمدی:استادیار، گروه محیط زیست, دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، جهرم، ایران
دکتر فرشید کفیل زاده : استادیار، گروه محیط زیست, دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، جهرم، ایران
نویسنده رابط: Dr.Kafilzadeh@yahoo.com
دکتر الهام کدیور: استادیار، گروه محیط زیست, دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان ، جهرم، ایران
دریافت : ۱۳۸۵/۱۲/۵ پذیرش : ۱۳۸٦/۱۰/۲

چکیده

زمینه و هدف : در این تحقیق باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH_S) از دریاچه مهارلو جداسازی و بهترین غلظت نمک برای تجزیه آن ها ، توسط باکتری های جدا شده بررسی گردید.

روش کار : در آزمایش های انجام شده از نفتالن و آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs استفاده گردید. محیط کشت اصلی در این آزمایش ONR7a می باشد. باکتری های تجزیه کننده PAHs جدا شده ، به عنوان میکروارگانیسم منتخب برای بررسی اثر میزان نمک بر تجزیه این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج : سودوموناس تنها باکتری تجزیه کننده PAHs جدا شده از آب و رسوبات دریاچه می باشد. بیشترین تعداد باکتری های تجزیه کننده نفتالن و آنتراسن در ایستگاه رودخانه خشک ، بترتیب با میانگین ۲۲۷ و ۱٦۷ در هر میلی لیتر آب و ۲۹۰ و ۱۹۳ در هر گرم رسوب بدست آمد. میانگین تعداد باکتری های تجزیه کننده نفتالن و آنتراسن به ترتیب در ایستگاه رودخانه پل فسا ۱۰۷ و ۷۳ درهر میلی لیتر آب و ۱۵۷ و ۱۲۷ در هر گرم رسوب ، در ایستگاه رودخانه نظر آباد ۲۷ و ۱۷ در هر میلی لیترآب و ٤۳ و ۲۰ در هر گرم رسوب ، در ایستگاه وسط دریاچه ٦۳ و ۳۳ در هر میلی لیتر آب و ۱۲۳ و ۷۳ در هر گرم رسوب و در ایستگاه غرب دریاچه ۳۰ و ۱۳ در هر میلی لیتر آب و ٤۳ و ۱۷ در هر گرم رسوب به دست آمد.

نتیجه گیری : با توجه به جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs از دریاچه ، کاملاً محرز است که بخشی از فرآیند پالایش بر عهده باکتری هاست. باکتری شاخص در این مورد سودوموناس است که در غلظت ٦٪ نمک قادر است PAHs را به صورت بهینه تجزیه کند.

واژگان کلیدی : هیدرو کربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH_S) ، غلظت نمک ، نفتالن ، آنتراسن ، دریاچه مهارلو، سودوموناس

مقدمه

دریاچه مهار لو در ۲۳ کیلومتری جنوب شرقی شیراز قرار گرفته و دارای آب شور با میزان نمک متوسط ۲۲۰ گرم در لیتر می باشد. این دریاچه تحت تاثیر رودخانه های فصلی خشک ، پل فسا، نظر آباد سروستان و سلامیه مورد هجوم انواع آلودگی ها قرار می گیرد. در بین آلاینده های ورودی به دریاچه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons از نظر آسیب های مختلف و مهم به انسان و محیط زیست از اهمیت خاصی برخوردار می باشند. این ترکیبات جزء آلاینده های نفتی بوده که در ساختمان آن ها حلقه های بنزنی به کار رفته است. PAHs از منابع مختلف شامل صنایع پتروشیمی ، فاضلاب های صنعتی و خانگی ، استخراج مواد نفتی ، داروسازی ، رنگ ،

پلاستیک ، حشره کش و غیره وارد اکوسیستم های آبی می شوند و به طور غیر مستقیم به انسان منتقل و عوارضی از جمله سرطان را منجر می گردند. تا کنون ۱۶ ترکیب PAHs به عنوان آلاینده های مهم در فهرست سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا آمده است. محل تجمع این ترکیبات در بدن ، بافت های چربی می باشد. از مهمترین آنها می توان به نفتالن ، آنتراسن، فنانترن، فلورن، کریزن، فلورانتن، پیرن و مشتقات اشاره کرد (عرفان منش و افیونی ۱۳۷۹).

یکی از راه های کاهش آلاینده های مختلف، روش بیولوژیک و استفاده از میکروارگانیسم ها می باشدکه به اصلاح زیستی (Bioremediation) معروف است. باکتری ها به علت داشتن آنزیم های مختلف تجزیه کننده نسبت به سایر میکروبها از اهمیت بیشتری برخوردارند (Zaidi and Imam 1999).

از مهمترین باکتری ها می توان به باسیلوس ، سود و موناس، و یبریوها و خانواده انتروباکتریاسه اشاره نمود (Bauer and Capone 1985) . در تجزیه ترکیبات آرو ماتیک مجموعه ای از عوامل بیولوژیک (نظیر فون بنتیک ، نوع موجود و تعداد آن) و عوامل غیر بیولوژیک (نظیر غلظت نمک، pH ، اکسیژن محلول، منبع نیتروژن و فسفر و سایر مواد محرک رشد) دخالت دارند(Jones and Alexander 1991).

باکتری های مختلفی که قادر به تجزیه PAHs با وزن مولکولی پائین مانند نفتالن ، آنتراسن و فلورن به عنوان منبع کربن و انرژی باشند، جداسازی و تعیین هویت شده اند. به عنوان مثال باکتری های متعلق به جنس سود و موناس ، آلکالیژنز ، و یبریو، میکوباکتریم، کوماموناس ، رودوکوکوس، سیکلوکلاستیکلوس ، از رسوبات دریایی و خاک جدا شده اند. جنس های سودوموناس و اسفینگوموناس نیز از آب جدا شده اند. با این حال هنوز اطلاعات کافی در زمینه اکولوژی باکتری های تجزیه کننده PAHs در دست نمی باشد(Diaz and Boyd 2002; Diaz and Grigson 2000).

در تحقیقی بر روی آب های بنادر امیر آباد و نوشهر ۱۶ نمونه باکتری گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن جداسازی گردید. به طوری که ۹ نمونه متعلق به جنس باسیلوس و ۷ نمونه کورینه باکتریم بوده است (امیر مظفری و همکاران ۱۳۸۵).

جاوید در سال ۱۳۸٤ میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات PAHs را در دریاچه طشک در استان فارس مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق مشخص شد که باکتری های هالوتولرانت در تجزیه نفتالن و آنتراسن دخالت داشته و بنابراین نقش مهمی در خود پالایی دریاچه دارند.

بهزادی در سال ۱۳۸٦ میکرو ارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات PAHs را از رودخانه خشک شیراز جداسازی کرد. در این تحقیق تمام باکترهای تجزیه کننده باسیلوس بودند و پراکنش این باکتری با افزایش نسبی دمای آب در اکثر ایستگاه های نمونه برداری شده بیشتر بوده است.

کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۵ باکتری های مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آن ها را در حذف هیدروکربن های نفتی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تعداد میکروارگانیسم های تجزیه کننده در نمونه های آب آلوده ارتباط زیادی با درجه آلودگی نفتی دارد. در این تحقیق ۱۵۸ سویه باکتریایی ، ۱۰ سویه آکتینومیست، ۹ سویه قارچ و۲ سویه مخمر جداسازی گردید.

تحقیقات انجام شده دیگر در مورد تجزیه میکروبی ترکیبات PAHs عبارتند از : جداسازی سویه جدیدی از سودوموناس باتوانایی تجزیه نفتالن توسط Garcia-Vales و همکاران در سال ۱۹۸۸ ، بررسی متابولیسم ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای در محیط های آلی توسط Cerniglia و همکاران در سال ۱۹۸۹، جداسازی باکتریهای تجزیه کننده فلورن توسط Grifoll و همکاران در سال ۱۹۹۲، جداسازی سویه هایی از باکتری میکوباکتری با توانایی تجزیه فنانترن توسط Boldrin و همکاران در سال ۱۹۹۳، جداسازی و تعیین هویت سویه های جدید از باکتری مارینو باکتر با قابلیت تجزیه هیدروکربنهای نفتی از

رسوبات اطراف ریشه های گیاه حرا توسط Fowler و همکاران در سال ۲۰۰۰ (Diaz and Grigson 2000)

در اطراف رودخانه های ورودی به دریاچه مهارلو به خصوص رودخانه خشک فعالیت های صنعتی ، شهری و کشاورزی زیادی مانند کارخانه روغن نباتی نرگس شیراز، کارخانه نوشابه سازی زمرم، کارخانه الکل سازی شیراز، پارس شیمی ، بیمارستان ها ، تعمیرگاه ها ، رستوران ها ، هتل ها، لباسشوئی ها و غیره وجود دارد که هر کدام در پساب های خود دارای ترکیبات PAHs مختلفی هستند و در نهایت به دریاچه تخلیه می گردند. مطالعات انجام شده در دریاچه مهارلو حاکی از آن است که غلظت نفتالن و فنانترن در آب به ترتیب ۰/۰۱۸ و ۰/۰۱۳ میلی گرم در لیتر و در رسوبات به ترتیب ۰/٤٥۱ و ppm ۰/۳۹۲ بوده است (کفیل زاده ۱۳۸۳). هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (نفتالن و فنانترن) از دریاچه مهارلو و یافتن بهترین غلظت نمک برای تجزیه آن ها، توسط باکتریهای جداشده می باشد.

روش کار

از آنجا که هدف اصلی این تحقیق، جداسازی باکتریهای تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای می باشد و با توجه به موقعیت جغرافیایی محل و رودخانه های ورودی و موقعیت دستیابی به دریاچه ، محدوده مطالعاتی مدخل ورودی رودخانه های خشک(A) ، پل فسا(B)، نظر آباد سروستان(C)، وسط دریاچه (D) وغرب دریاچه (E) ، به عنوان ایستگاه های انتخابی تعیین گردید، تا وضعیت میکروبی در قسمت های مختلف دریاچه و همچنین ورودی رودخانه ها مشخص گردد. رودخانه خشک از شمال دریاچه، رودخانه پل فسا از شمال غربی و رودخانه نظرآباد سروستان از جنوب دریاچه وارد می شوند(شکل ۱). عمق متوسط دریاچه ۲/۵ متر، فصل نمونه گیری اواخر بهار سال ۱۳۸۵ و بعد از اتمام بارندگی های سالیانه می باشد.

نمونه برداری آب از عمق ۲۵ سانتیمتری یعنی قسمت سطحی آب انجام شد چون در این قسمت حداکثر میزان اکسیژن جهت فعالیت باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری فراهم است. همچنین نمونه برداری رسوب از قسمت سطحی یعنی عمق ۰/۵ سانتیمتری بستر انجام شد زیرا در این بخش نیز اکسیژن وجود دارد و بعد از آن شرایط بی هوازی می شود و امکان تجزیه ترکیبات PAHs وجود ندارد (Moopam 1999).

نمونه برداری آب از عمق ۲۵ سانتیمتری (قسمت سطحی) و رسوب ازعمق ۰/۵ سانتیمتری بستر دریاچه انجام شد (از هر ایستگاه سه بار). سپس نمونه ها در ظروف شیشه ای (شسته شده با اسید و استریل) و در محفظه یخ به آزمایشگاه منتقل شده و توسط روش های میکروبی مورد آنالیز قرار گرفتند.

مرحله اصلی برای جداسازی میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات PAHs ، تهیه محیط کشتی است که به عنوان تنها منبع کربن آن از PAHs استفاده شده است. مشکل اصلی در این مورد وارد کردن ترکیبات PAHs غیر محلول در آب به محیط کشت است. برای رفع این مشکل از روش اسپری کردن محلول ۲٪ PAHs در استن بر روی محیط کشت اصلی استفاده شد(محلول PAHs در استن به وسیله فیلتر استریل گردید). محیط کشت اصلی در این آزمایش ONR7a می باشد. ترکیبات این محیط کشت به منظور جلوگیری از ایجاد رسوب ، به صورت سه محلول جداگانه تهیه و پس از استریل کردن در اتو کلاو و سرد شدن تا ۵۰ درجه سانتیگراد، با هم مخلوط گردیدند. در واقع محیط کشت ONR7a یک محیط کشت مصنوعی آب دریا است که توسط ۱/۲٪ آگار به صورت جامد در آمده است (Kasai and Kishira 2002).

به منظور آماده سازی قبل از کشت، نمونه های آب دریاچه به نسبت ۱:۱۰ به وسیله محیط ONR7a مایع و استریل رقیق سازی شدند. همچنین ۱ گرم از هر نمونه رسوب منتقل شده به آزمایشگاه با ۱۰ میلی لیتر از محیط ONR7a مایع استریل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه شیک

گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده هم بر روی محیط ONR7a واجد نفتالن و هم بر روی محیط ONR7a واجد آنتراسن بصورت کشت سطحی ، کشت داده شد. برای هر نمونه سه بار کشت بر روی هر محیط انجام گرفت. سپس پلیت ها به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. برای جلوگیری از تبخیر رطوبت محیط ها، اطراف آن ها توسط پارافیلم مسدود شد. کلنی های ایجاد شده برروی محیط که دارای هاله شفاف بودند به عنوان کلنی های تجزیه کننده ترکیبات PAHs محسوب گردیدند. میانگین تعداد کلنی های موجود در روی سه محیط مربوط به یک نمونه ثبت شد. بعد از پایان مدت گرمخانه گذاری و شمارش باکتری ها، کلنی ها از نظر مرفولوژی ، رنگ و اندازه مورد بررسی قرار گرفتند. سپس کلنی ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار خالص سازی شدند و مورد آزمایش های تعیین هویت از قبیل : رنگ آمیزی گرم ، بررسی خصوصیات مرفولوژیک ، کاتالاز و اکسید از و سایر تست های تشخیص افتراقی قرار گرفتند (Kasai and Kishira 2002).

باکتری های تجزیه کننده PAHs جدا شده طی آزمایش قبلی، به عنوان میکروارگانیسم منتخب برای بررسی اثر میزان نمک بر تجزیه PAHs مورد استفاده قرار گرفت. پس از تهیه کشت خالص باکتری، باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد (rmp ۹۰ و۲۵ درجه سانتی گراد) و بعد از ۲٤ ساعت برای بدست آوردن توده سلولی در ٤۵۰۰ دور ، محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سه بار با محیط کشت ONR7a مایع استریل شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون باکتری بر طبق استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شده و از آن بصورت ۵٪ حجمی – حجمی به عنوان مایع تلقیح اولیه به محیط های کشت استفاده گردید (Diaz and Grigson 2000) برای انجام این آزمایش محیط کشتONR7a با غلظت های مختلف نمک NaCl (۰٪، ۲٪، ٤٪، ۸٪، ۱۰٪ ، ۱۲٪ ، ۱٤٪، ۱٦٪ ، ۱۸٪ ، ۲۰٪ و ۲۲٪) ، به میزان ۱۰۰ میلی لیتر در ارلن هایی با حجم ۵۰۰ میلی لیتر تهیه شد (از هر کدام دوتا، یکی برای نفتالن و یکی برای آنتراسن). سپس به هر ارلن PAHs مربوط به آن (نفتالن یا آنتراسن) ، به میزان یک میلی گرم در میلی لیتر اضافه گردید. به هر ارلن سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در مرحله قبل اضافه شد. از دو ارلن حاوی محیط کشت و PAHs (یکی با نفتالن و یکی با آنتراسن) و بدون تلقیح توسط سوسپانسیون باکتریایی نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. سپس تمامی ارلن ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و۹۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شدند (Kasai and Kishira 2002).

اندازه گیری جذب در طول موج ٤۸۰ نانومتر به صورت روزانه انجام و یاد داشت گردید. این کار تا ۱۰ روز پس از تلقیح انجام شد. از ارلن های شاهد بدون تلقیح باکتری برای کالیبره کردن دستگاه استفاده گردید (Sisler and Zobell 1987).

برای مقایسه ایستگاه ها از نظر تفاوت میانگین تعداد باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs در آب و رسوب از آزمون های ANOVA و دانکن استفاده گردید. سطح خطای مورد نظر ۵٪ می باشد. همچنین برای مشخص کردن ارتباط بین میزان تجزیه PAHs توسط باکتری با غلظت نمک از آزمون همبستگی (Correlation) و تعیین r استفاده شد.

نتایج

در جدول ۱ میانگین های تعداد باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs در آب و رسوب دریاچه در سطح احتمال ۵ ٪ مقایسه شده اند. آزمون های ANOVA و دانکن نشان می دهند که از نظر میانگین تعداد باکتریهای تجزیه کننده ترکیبات PAHs در آب و رسوب دریاچه بین دو ایستگاه رودخانه نظر آباد و غرب دریاچه تفاوت معنی داری وجود ندارد (p>۰/۰۵). در حالیکه بین سایر ایستگاه ها اختلاف معنی داری ملاحظه گردید (p<۰/۰۵). ایستگاه های رودخانه خشک، رودخانه پل فسا، وسط

دریاچه ، غرب دریاچه و نظر آباد سروستان به ترتیب بیشترین تعداد باکتری را در آب و رسوب دریاچه داشتند.

در بررسی میزان تجزیه ترکیبات PAHs در طول موج ٤٨٠ نانومتر در طی ده روز دوره آزمایش مشخص شد که نفتالن بیشتر از آنتراسن تجزیه می شود. میزان تجزیه از غلظت صفر تا ٦ ٪ با افزایش میزان نمک افزایش یافته و در ٦ ٪ به حداکثر خود می رسد (r=+۰/٦۲) و از ٦ ٪ تا ۲۲٪ با افزایش میزان نمک از تجزیه کم می شود (r= -۰/۵۲). در نمونه شاهد با غلظت نمک ۲۵٪ هیچ گونه تجزیه ای رخ نمی دهد (جدول ۲). به عنوان مثال در نمودار ۱ میزان تجزیه در غلظت های مختلف نمک در روز ششم نشان داده شده است.

همچنین با افزایش زمان بر میزان مواد حاصل از اکسید اسیون ترکیبات PAHs افزوده شده و میزان جذب افزایش می یابد و در روز دهم در غلظت ٦٪ به حداکثر خود در دوره آزمایش می رسد (نمودار ۲).

آزمون t تفاوت معنی داری بین میانگین تعداد باکتری های تجزیه کننده نفتالن و آنتراسن نشان می دهد (P<۰/۰۵) . به طوری که تعدادی باکتری هایی که قادرند نفتالن را تجزیه کنند از تعداد باکتری های تجزیه کننده آنتراسن بیشتر است.

تفاوت بین غلظت نفتالن در آب و رسوب در ایستگاههای رودخانه خشک ، رودخانه پل فسا، رودخانه نظر آباد، وسط دریاچه و غرب دریاچه به ترتیب ۱۳,٦۰,۱٦,۵۰,٦۳ (بطور متوسط ٤۰) و تفاوت بین غلظت آنتراسن در آب و رسوب در ایستگاه های مذکور به ترتیب ٤۰,۳,۵٤,۲٦ و ٤ (به طور متوسط۲۵) می باشد . به طور کلی میزان این باکتری ها در رسوبات دریاچه بیشتر از آب دریاچه می باشد و اختلاف معنی داراست (P<۰/۰۵).

براساس آزمایش های انجام شده کلیه باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs، *Pseudomonas sp.* بودند.

بحث

در آزمایش های انجام شده از نفتالن و آنتراسن به عنوان سوبسترای PAHs و به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده گردید. به طوری کلی تعداد باکتری هایی که قادر به تجزیه نفتالین بودند از تعداد باکتری های تجزیه کننده آنتراسن بیشتر بدست آمد و میزان این باکتری ها در رسوبات دریاچه بیشتر از آب دریاچه بود. در بین ترکیبات نفتی، ترکیبات آروماتیک به لحاظ داشتن حلقه های بنزنی دارای پایداری بیشتری بوده و هر چه تعداد حلقه های بنزنی بیشتر باشد، تجزیه میکروبی آن نیز سخت تر خواهد بود (Bauer and Capone 1985). بر طبق نتایج تحقیق حاضر از آنجا که نفتالن یک ترکیب آروماتیک دو حلقه ای است، نسبت به آنتراسن سه حلقه ای راحت تر و سریع تر مورد تجزیه باکتری ها قرار می گیرد. از طرفی به دلیل جو آرام دریاچه ، کلیه مواد معلق از جمله باکتری ها و مواد غذایی رسوب می کنند. در مورد ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای نیز باید به این نکته اشاره کرد که این ترکیبات با اتصال به ذرات معلق و رسوب کردن به همراه آن ها وارد رسوبات دریاچه می شوند و در اختیار باکتری ها قرار می گیرند.

براساس نتایج بدست آمده کاملاً مشخص است که تنوع متابولیک (Metabolic diversity) (قابلیت استفاده از سوبسترا) و قابلیت تجزیه ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای (نفتالن و آنتراسن) با افزایش غلظت نمک از صفر تا ٦٪ افزایش می یابد و در ٦٪ به اوج خود می رسد. علت این پدیده احتمالاً به علت رشد و فعالیت بهینه باکتری سودوموناس مورد استفاده در این آزمایش در حضور غلظت ٦٪ نمک و ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای است. با افزایش غلظت نمک از ٦ ٪ به بالا از تنوع متابولیک این باکتری کاسته شده و تجزیه سوبسترای هیدروکربنی آروماتیک چند حلقه ای کاهش پیدا می کند.

Juhasz و همکاران در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسیدند که با افزایش غلظت نمک از صفر تا ۸ ٪ قابلیت تجزیه ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای توسط باکتری

Pseudomonas cepacia افـزایش و در ۸ ٪ بـه حداکثر خود می رسد و پـس از آن کـاهش مـی یابـد. در صورتیکه در تحقیق حاضر حداکثر تجزیه در غلظت نمک ٦٪ مشاهده گردید.

Tiehm در سال ۲۰۰۵ میزان تجزیه نفتالن و فنـانترن را در حضور فاکتورهای مختلف مورد بررسی قـرار داد و نتیجه گرفـت کـه قابلیـت تجزیـه ایـن ترکیبـات توسـط باکتریهای جداشده از آب در غلظت های نمـک حـدود ٦ تا ۹ ٪ به حداکثر خود می رسـد و پـس از آن بـه شـدت کاهش می یابد. در تحقیق حاضر نیز نتیجه نسبتاً مـشابهی به دست آمد.

طبق تحقیقات انجام شده توسط Riis در سال ۲۰۰٤، میکروارگانیسم ها در غلظت های بالای نمک ترجیح مـی دهند از سوبسترا هایی استفاده کنند که راحت تـر تجزیـه شوند. یا به عبارت دیگـر، در حـضور سوبـستراهایی کـه راحت تر تجزیه شوند و در اختیار میکروارگانیسم ها قرار گیرند، میکروارگانیسم قادر خواهد بود شـرایط سـخت را تحمل کند و دقیقاً به همین علت در تحقیق حاضر میـزان تجزیه نفتالن از آنتراسن در غلظـت هـای مختلـف نمـک بیشتر است.

علاوه بر میـزان غلظـت نمـک، فـاکتور زمـان نیـز در تجزیه PAHs دخالت دارد. با افزایش زمان برمیزان مـواد حاصل از تجزیه ایـن ترکیبـات افـزوده مـی شـود. نتـایج حاصل از اندازه گیری جذب در ٤۸۰ نانومتر حـاکی از آن است که در تمام غلظت های نمک ، میزان تجزیـه در روز دهم بیشتر از روزهای دیگر است و این به علـت سـازگار شدن میکروارگانیسم ها با غلظت نمـک و افـزایش تولیـد آنزیم هـای لازم بـرای تجزیـه و افـزایش میـزان رشـد و فعالیت باکتری هـا بـا گذشـت زمـان اسـت.Filonov و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسیدند که میزان تجزیـــه نفتـــالن توســـط ســـویه هـــای بـــاکتری *Pseudomonas putida* جدا شده از آب و خاک های آلوده با گذشت زمان افزایش می یابد. به طوریکـه میـزان تجزیه در روز آخر بیشتر از روزهای دیگر است.

Diaz و Grigson در سال ۲۰۰۰ مشخص کردند کـه تجزیه زیستی نفت خام در شرایطی با غلظت نمک دو برابـر نسبت به پساب های صنعتی، کاهش می یابد . با ایـن حـال آنها نشان دادند که حتی در غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر NaCl نیز تجزیه زیستی در حد قابل توجهی انجام می گیرد.

Ward و Brock در سال ۱۹۷۸ مشخص کردنـد کـه متابولیسم هیدروکربن ها با افزایش میزان نمک از ۳۳ تا ۲۸٤ گرم در لیتر کاهش مـی یابـد. در گـزارش دیگـر Millet و Bianchi در سال ۱۹۹۱، به این نکته اشاره کردند که میزان تجزیه نفت در ابتدا با افزایش غلظت نمک تـا ۰/٤ مـول در لیتـر ($^{g}/_{lit}$ ۲۳/۳) ، افـزایش پیـدا مـی کنـد و پـس از آن بـا افزایش غلظت نمک ، کاهش می یابد.

در تحقیقاتی کـه توسـط Bertrand و Almallah در سال ۱۹۹۰ در یک باتلاق نمکی انجـام شـد، بـاکتری هـای موجود در آب با تلاق قـادر بودنـد در غلظـت هـای نمـک کمتر از $^{g}/_{lit}$ ۱۰۰ هیدروکربن ها را تجزیـه کننـد و ایـن در حالی است که باکتری های جدا شده از رسوب باتلاق ، هم در غیاب نمک و هـم در غلظـت $^{g}/_{lit}$ ۱۱٦ نمـک قـادر بـه تجزیه هیدروکربن ها بودند.

Plotnikova و Altyntseva در سال ۲۰۰۱ گـزارش دادند که سویه های جدا شده قادر به رشد در حضور نفتالن و غلظت ۸/۵ ٪ نمـک مـی باشـند. برخـی از سـویه هـا در غلظت پائین تر نمک روی فنانترن، بـی فنیـل، ان – اکـتن و فنل نیز رشد کردند.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن موارد فوق این نتیجه بدست می آید که دریاچه مهارلو در روند اصلاح زیـستی نقـش دارد. بـه ایـن ترتیب که آب آلوده بـا ورود بـه دریاچـه و گـذر از منـاطق مختلف (به عنوان مثال ایستگاه های نمونه برداری) توسط میکروارگانیسم های موجود در آب دریاچه مورد تجزیه قرار می گیرد. از طرفی مقداری از آلاینده ها نیز بـا ایجـاد پیونـد با ترکیبات مختلف ، در دریاچه رسـوب کـرده و در اختیـار باکتری های موجود در رسوبات قرار می گیرند. احتمال این

اتفاق نیز وجود دارد که بخشی از آلودگی های وارد شده به دریاچه نیز دچار حذف فیزیکی و شیمیایی شوند، به عنوان مثال اکسید اسیون فیزیکی و شیمیایی. اما با توجه به جداسازی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs از دریاچه ، کاملاً محرز است که بخشی از فرآیند پالایش بر عهده باکتری هاست. باکتری شاخص در این مورد سودوموناس است که در غلظت ٦ ٪ نمک قادر است PAHs را به صورت بهینه تجزیه کند.

پیشنهادات : نظر به اینکه در تجزیه باکتریایی ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای عوامل دیگری نظیر حرارت ،pH، اکسیژن محلول و غیره دخالت دارند، پیشنهاد می گردد در تحقیقات بعدی تاثیر این عوامل نیز روی تجزیه باکتریایی ترکیبات PAHs بررسی شود. همچنین مطالعه در ارتباط با اینکه آیا سودوموناس در کنار منبع کربن دیگر، تمایلی به استفاده از نفتالن یا فنانترن دارد در دسترس نبوده و نیاز به مطالعات بیشتر در مقیاس های آزمایشگاهی با غلظت های مختلف نفتالن و فنانترن و منابع دیگر انرژی دارد.

تشکر و قدردانی

از کلیه پرسنل محترم اداره کل حفاظت محیط زیست استان فارس که به انحاء مختلف در به اتمام رساندن این پروژه همکاری و تلاش نمودند، تشکر و سپاسگزاری می گردد.

جدول ۱ - مقایسه میانگین های* تعداد باکتری های تجزیه کننده ترکیبات PAHs در آب و رسوب دریاچه

ایستگاه	میانگین تعداد باکتری ها در هر میلی لیتر		میانگین تعداد باکتری ها در هر گرم رسوب	
	نفتالن	آنتراسن	نفتالن	آنتراسن
A	۲۲۷	۱٦۷	۲۹۰	۱۹۳
رودخانه خشک	a	a	a	a
B	۱۰۷	۷۳	۱۵۷	۱۲۷
رودخانه پل فسا	b	b	b	b
C	۲۷	۱۷	٤۳	۲۰
رودخانه نظر آباد	c	c	c	c
D	٦۳	۳۳	۱۲۳	۷۳
وسط دریاچه	d	d	b	d
E	۳۰	۱۳	٤۳	۱۷
غرب دریاچه	c	c	c	c

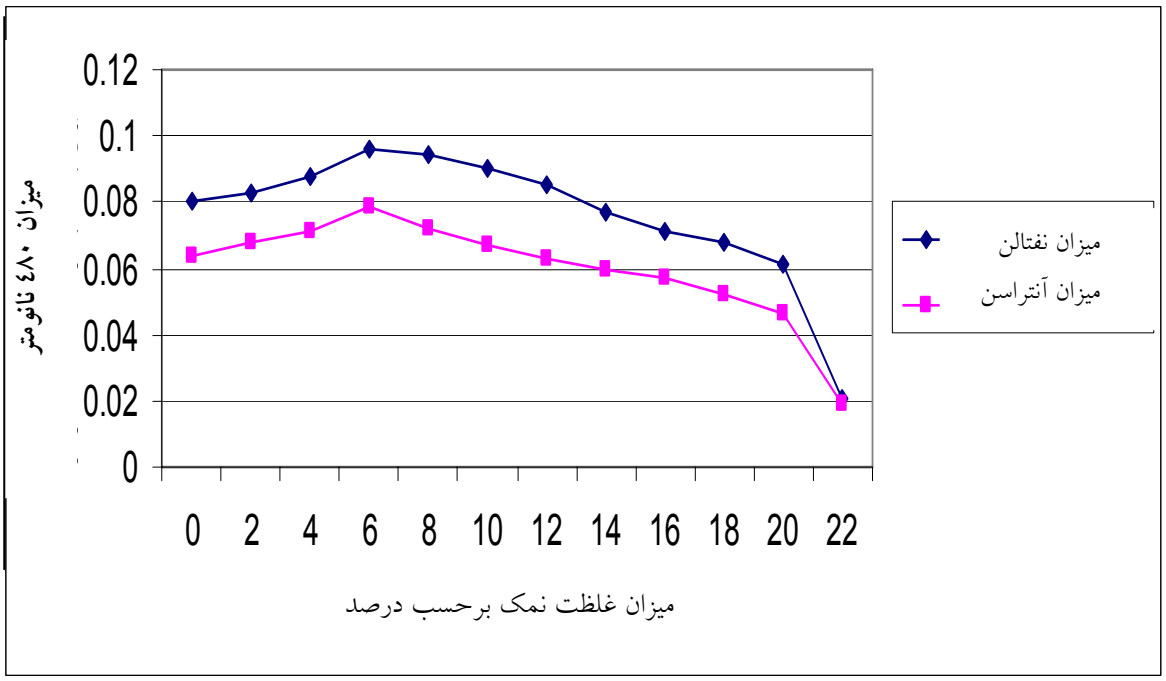
* تفاوت بین میانگین های موجود در هر ستون که دارای حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن معنی دار نیستند (P> ۰/۰۵).

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت نمک NaCl در جذب ترکیبات PAHs توسط باکتری های تجزیه کننده

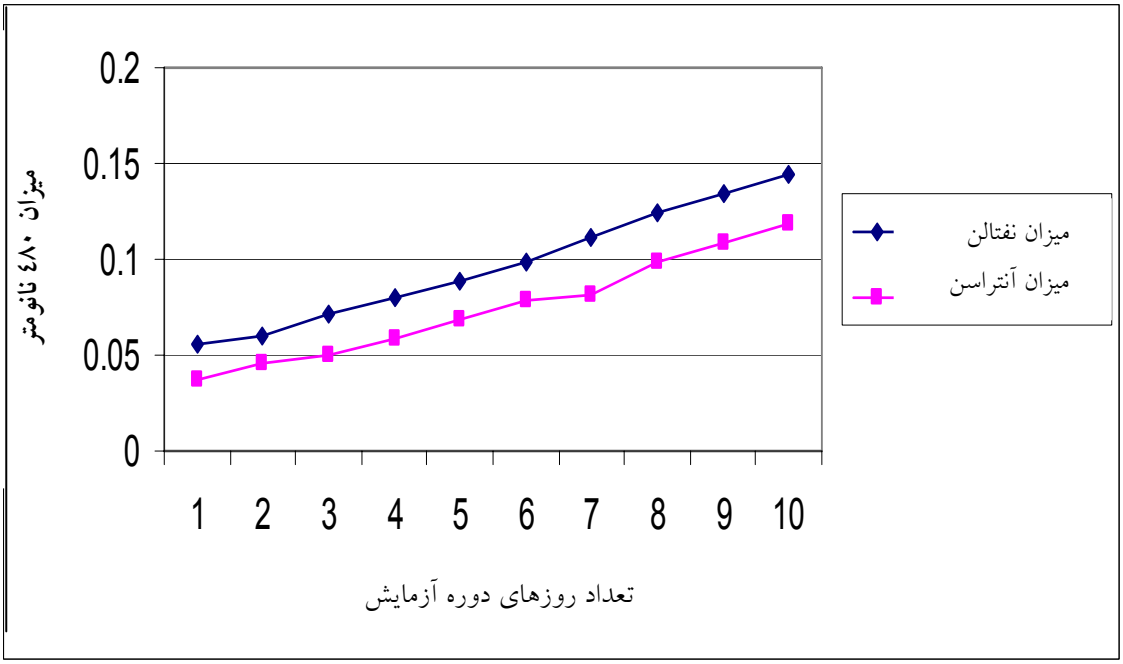
غلظت نمک	روز ۱		روز ۲		روز ۳		روز ٤		روز ٥	
بر حسب درصد	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن
۰	۰/۰۳۰	۰/۰۲۲	۰/۰۳۸	۰/۰۳۰	۰/۰٤٥	۰/۰۳۹	۰/۰٥٦	۰/۰٤٤	۰/۰٦۷	۰/۰٥۲
۲	۰/۰۳۲	۰/۰۲٦	۰/۰٤۲	۰/۰۳۷	۰/۰٥٥	۰/۰٤۲	۰/۰٦۰	۰/۰٤۹	۰/۰۷۱	۰/۰٥۷
٤	۰/۰٤۸	۰/۰۳۱	۰/۰٥٥	۰/۰٤۰	۰/۰٦٦	۰/۰٤٥	۰/۰۷٤	۰/۰٥۱	۰/۰۷۸	۰/۰٦۰
٦	۰/۰٥٦	۰/۰۳۷	۰/۰٦۰	۰/۰٤٦	۰/۰۷۱	۰/۰٥۰	۰/۰۸۰	۰/۰٥۹	۰/۰۸۹	۰/۰٦۸
۸	۰/۰٥۱	۰/۰۳٥	۰/۰٥۸	۰/۰٤۳	۰/۰٦۸	۰/۰٤۷	۰/۰۷٦	۰/۰٥٤	۰/۰۸۱	۰/۰٦٤
۱۰	۰/۰٤٦	۰/۰۳۲	۰/۰٥٤	۰/۰٤۰	۰/۰٦٤	۰/۰٤٥	۰/۰۷۱	۰/۰٥۰	۰/۰۷۸	۰/۰٥۹
۱۲	/۰٤۰	۰/۰۳۰	/۰٥۰	۰/۰۳۸	۰/۰٥۸	۰/۰٤۰	۰/۰٦۸	۰/۰٤٦	۰/۰۷٥	۰/۰٥٤
۱٤	۰/۰۳۰	۰/۰۲٦	۰/۰٤۸	۰/۰۳۱	۰/۰٥٤	۰/۰۳۷	۰/۰٦٥	۰/۰٤۲	۰/۰۷۱	۰/۰٥۰
۱٦	۰/۰۲۷	۰/۰۲۳	۰/۰٤۱	۰/۰۲۹	۰/۰٤۹	۰/۰۳٤	۰/۰٥۷	۰/۰۳۹	۰/۰٦٦	۰/۰٤٦
۱۸	۰/۰۲۱	۰/۰۱٤	۰/۰۳٦	۰/۰۲۱	۰/۰٤۱	۰/۰۲۸	۰/۰٥۱	۰/۰۳۱	۰/۰٥۹	۰/۰٤۰
۲۰	۰/۰۱۸	۰/۰۱۱	۰/۰۳۲	۰/۰۱۸	۰/۰۳۸	۰/۰۲٥	۰/۰٤٦	۰/۰۲۹	۰/۰٥۲	۰/۰۳۷
۲۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰٥	۰/۰۱۰	۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۱۱	۰/۰۱٦	۰/۰۱٤	۰/۰۱۸	۰/۰۱٦

جدول ۲ : ادامه ...

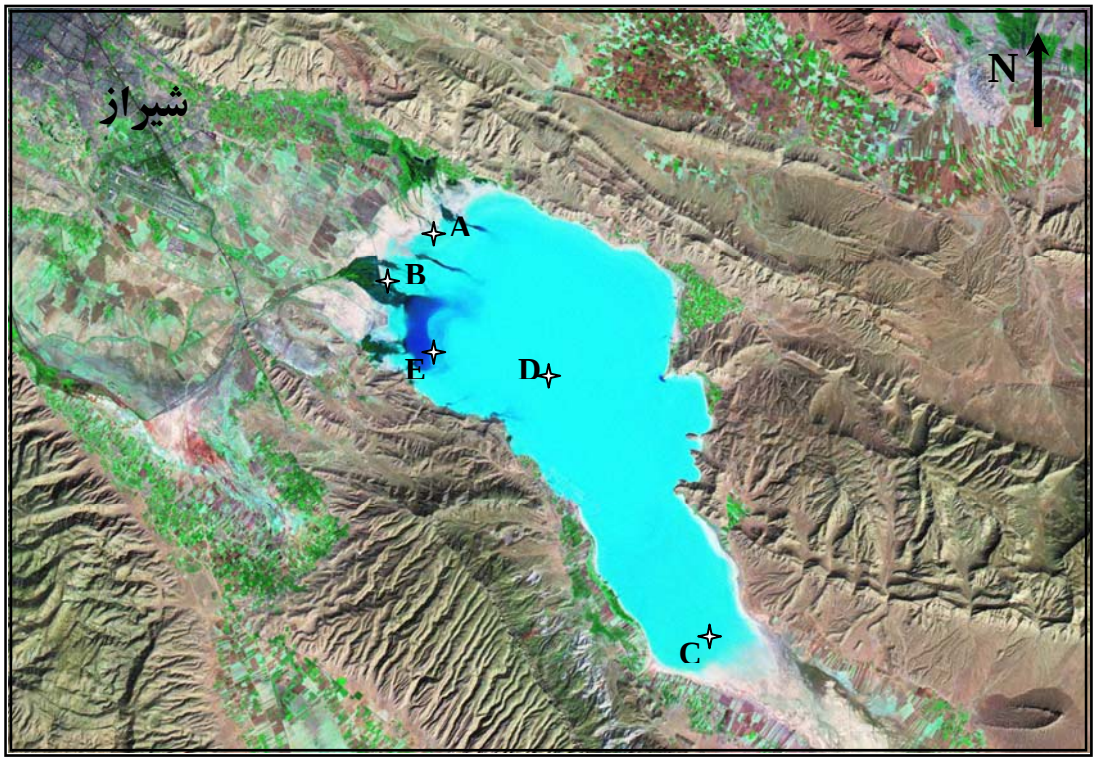
غلظت نمک	روز٦		روز ۷		روز ۸		روز ۹		روز ۱۰	
بر حسب درصد	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن	نفتالین	آنتراسن
۰	۰/۰۸۰	۰/۰٦٤	۰/۰۸۸	۰/۰۷۰	۰/۰۹٦	۰/۰۸۱	۰/۱۰۸	۰/۰۹۳	۰/۱۱۸	۰/۰۹۸
۲	۰/۰۸۳	۰/۰٦۸	۰/۰۹۲	۰/۰۷٤	۰/۱۱۱	۰/۰۸۹	۰/۱۱۹	۰/۰۹۸	۰/۱۲۷	۰/۱۰٤
٤	۰/۰۸۸	۰/۰۷۱	۰/۰۹۷	۰/۰۷۸	۰/۱۱۷	۰/۰۹۳	۰/۱۲٥	۰/۱۰۱	۰/۱۳٦	۰/۱۱۰
٦	۰/۰۹۸	۰/۰۷۹	۰/۱۱۲	۰/۰۸۲	۰/۱۲٥	۰/۰۹۸	۰/۱۳٤	۰/۱۰۸	۰/۱٤٥	۰/۱۱۹
۸	۰/۰۹٤	۰/۰۷۲	۰/۱۰۲	۰/۰۷۹	۰/۱۲۱	۰/۰۹۰	۰/۱۲۹	۰/۱۰۲	۰/۱۳۳	۰/۱۱٥
۱۰	۰/۰۹۰	۰/۰٦۷	۰/۰۹۸	۰/۰۷٥	۰/۱۱۹	۰/۰۸٦	۰/۱۲۳	۰/۰۹۹	۰/۱۳۰	۰/۱۰۹
۱۲	۰/۰۸٥	۰/۰٦۳	۰/۰۹۲	۰/۰۷۱	۰/۱۱۳	۰/۰۸۱	۰/۱۱۷	۰/۰۹۳	۰/۱۲۸	۰/۱۰۱
۱٤	۰/۰۷۷	۰/۰٦۰	۰/۰۸۹	۰/۰٦۹	۰/۱۰۱	۰/۰۷۸	۰/۱۱۰	۰/۰۹۸	۰/۱۲۰	۰/۰۹۷
۱٦	۰/۰۷۱	۰/۰٥۷	۰/۰۸۲	۰/۰٦۲	۰/۰۹۸	۰/۰۷۲	۰/۱۰۷	۰/۰۸٥	۰/۱۱٦	۰/۰۹٤
۱۸	۰/۰٦۸	۰/۰٥۲	۰/۰۷٦	۰/۰٥۸	۰/۰۹۳	۰/۰٦٦	۰/۱۰۱	۰/۰۷۱	۰/۱۱۱	۰/۰۹۰
۲۰	۰/۰٦۱	۰/۰٤٦	۰/۰۷۰	۰/۰٥۱	۰/۰۸٤	۰/۰٥۹	۰/۰۹۸	۰/۰٦٦	۰/۱۰۹	۰/۰۸٤
۲۲	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹	۰/۰۲۲	۰/۰۲۰	۰/۰۲۳	۰/۰۲۲	۰/۰۲٤	۰/۰۲٤	۰/۰۲٦	۰/۰۲٥



نمودار ۱ – میزان جذب PAHs *توسط* *Pseudomonas* sp. در غلظت های مختلف نمک در روز ششم



نمودار ۲ – میزان جذب PAHs توسط باکتری *Pseudomonas sp.* در غلظت ٦٪ نمک در طی ده روز دوره آزمایش



شکل ۱- نقشه ماهواره ایی ایستگاه های نمونه برداری در دریاچه مهارلو

منابع

امیر مظفری، ن.، نوری، ن. و صفری ، ر.، ۱۳۸۵. فون باکتری های گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن از آب های بنادر امیر آباد و نوشهر و مقایسه آن ها از نظر اصلاح زیستی . فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره هشتم، شاره دوم ، صفحه ۱۰۱ تا ۱۰۸.

بهزادی، س.، ۱۳۸٦. جداسازی و شناسایی میکروارگانیسمهای تجزیه کننده ترکیبات PAH از رودخانه خشک شیراز. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی . دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم .

جاوید، ح.، ۱۳۸٤. جداسازی و شناسایی باکتری های هالوفیل و هالوتولرانت از دریاچه طشک و نقش آن ها در اصلاح زیستی ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای . پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی . دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

عرفان منش، م. و افیونی، م.، ۱۳۷۹. آلودگی محیط زیست (آب ، خاک و هوا). نشر ارکان اصفهان، چاپ سوم.

کارگر، م.، کفیل زاده، ف. و نوحی، ا.، ۱۳۸۵. شناسایی باکتریهای مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آن ها در حذف هیدروکربن های نفتی . فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست . دوره هشتم ، شماره دوم : ۱۱۸-۱۰۹.

کفیل زاده، ف.، ۱۳۸۳. اندازه گیری هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH_s) در آب و رسوبات دریاچه مهارلو. طرح پژوهشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم .

Bauer, J.E. and Capone, D.E., 1985. Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. Appl. *Environ. Microbiol.* **49**, pp. 828-835.

Bertrand, J. and Almallah, M., 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophil archaebacterium. LETT. *Appl.microbiol.***11,** pp. 260-263.

Diaz, M. and Boyd, K., 2002. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial

Tiehm, A., 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **89**, pp. 258-263.

Ward, D. and Brock, T., 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35,** pp. 353-359.

Zaidi, R. and Imam, H., 1999. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the caribben coastal water. *Mar. pollut. Bull.* **38**(8), pp. 737-742.

consortium MPD-M,immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology & Bioengineering.* **79**(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. **2**, pp. 522-532.

Filonov, A.E., Puntus, I.F. and Karpov, A.V., 2003. Growth and survival of *pseudomonas putida* strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels. *Proc. Biochem.* **43,** pp. 303-308.

Jones, S.H. and Alexander, M., 1991. Factors effecting the microbial degradation of phenanthrene. Appl. *Microbiol and Biotechnol*.**35**, pp. 401-405.

Juhasz, A.L., Britz, M.L. and Stanley, G.A., 2005. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. *J. Appl. Microbiol* . **83**, pp, 189-198.

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.* **68**(11), pp. 5625-5633.

Manual of oceanographic observations and pollutant analysis methods (MOOPAM), 1999. ROPME.Kuwait.

Millet, G. and Bianchi, M., 1991. Effect of salinity on petroleum biodegradation.Fresenius *J. Anal. Chem.* **339**, pp. 788-791.

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* **. 70 ,** pp. 51-58.

Riis, V., 2004. Influence of high salinities on degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Can. J. Microbiol.* **49,** pp. 713-721.

Sisler, F. and Zobell, D., 1987. Microbial utilization of carcinogenic hydrocarbon. *Science.* **106**, pp. 521-2.