مقایسه توانایی باکتری‌ها و قارچ‌ها در تیمارزیستی آب و خاک آلوده به ۲،۴،۶- تری‌نیتروتولوئن

گلاره شیبانی، فرشته نعیم‌پور*

تهران، دانشگاه علم و صنعت، دانشکده مهندسی شیمی، آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی

پیام نگار: **fnaeim@iust.ac.ir**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۱

زمان پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

چکیده

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی به منظور یافتن روش‌های اقتصادی پاکسازی محیط زیست از آلاینده‌های ساخته دست بشر صورت گرفته و در این میان فرایندهای تیمار زیست‌شناختی بسیار مورد توجه می‌باشند. به دلیل سمیت و اثرات موتاژن مواد منفجره نیتروآروماتیک، این آلاینده‌ها نیز یکی از معضلات محیط زیست محسوب می‌شوند و در این میان ۲،۴،۶- تری‌نیتروتولوئن به دلیل استفاده گسترده نظامی و صنعتی سهم بیشتری در آلودگی آب و خاک دارد. در این تحقیق، ابتدا تبدیل‌زیستی[1] این آلاینده در فاز آب حاوی (mg/l)۱۰۰ تری‌نیتروتولوئن (معادل انحلال‌پذیری آن در آب) توسط ۷ سویه باکتریایی و قارچی با پتانسیل زیست سالم‌سازی ترکیبات حلقوی بررسی گردید. نتایج نشان دهندهٔ برتری باکتری سودوموناس پتیدا[2] در تبدیل‌زیستی کامل تری‌نیتروتولوئن در شرایط هوازی می‌باشند. سپس توانایی این سویه در زیست‌سالم‌سازی یک خاک آلوده به (mg/kg)۱۰۰۰ تری‌نیتروتولوئن در فاز دوغابی طی ۲۵ روز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج، نشان‌دهنده تبدیل‌زیستی بیش از ۹۷٪ این آلاینده در خاک می‌باشند.

کلمات کلیدی: زیست‌سالم‌سازی، تری‌نیتروتولوئن، فاز دوغابی، سودوموناس پتیدا

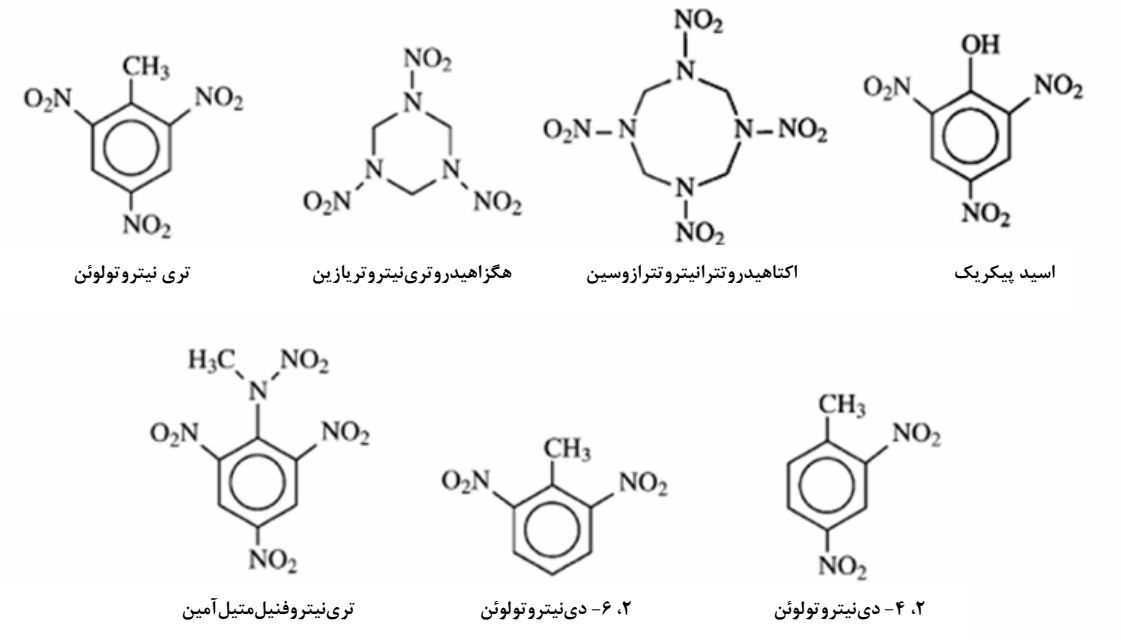
۱- مقدمه

از حدود سال ۱۸۳۰ میلادی، به دنبال پیشرفت شیمی آلی، محققین ترکیبات جدید بسیاری را از طریق واکنشهای نیتروردار کردن سنتز کردند و طی این سالها خاصیت انفجاری بسیاری از این ترکیبات نیتراته شناسایی شده است. در ۱۰۰ سال گذشته، تولید مهمات و مواد منفجره نیتروآروماتیک در مقیاس بالا جهت استفاده صنعتی و نظامی، یکی از عوامل مهم در آلودگی محیط زیست به شمار می‌رود. مراکز نظامی به عنوان مولد مواد منفجره و ترکیبات جانبی حاوی نیترات بخش قابل توجهی از خاک و آب آلوده به این ترکیبات را ایجاد می‌کنند [۱]. علاوه بر پساب ناشی از فرایند تولید، مانورهای نظامی، روش‌های مختلف انهدام و تخریب مواد تاریخ گذشته و مهمات معیوب، زمینه‌ساز پراکنده‌شدن این ترکیبات پرانرژی در محیط زیست و شکل‌گیری الگوهای مختلف آلودگی آب و خاک می‌باشند [۳و۲]. شکل (۱) انواعی از ترکیبات منفجره نیتروآروماتیک آلاینده را نشان می‌دهد و در میان ایزومر ۲،۴،۶- تری‌نیتروتولوئن که طی واکنش‌های نیتراسیون پی‌درپی تولوئن با مخلوطی از اسید نیتریک و سولفوریک تولید می‌شود، ماده منفجره ارزشمندتری برای استفاده نظامی است و سهم بیشتری در آلودگی

1. Biotransformation
2. *Pseudomonas putida*

آب و خاک دارد. اساساً تری‌نیتروتولوئن به دلیل پایداری ذاتی خود حساسیت کمتری به ضربه و اصطکاک دارد و در نتیجه استفاده از آن ریسک انفجارهای غیرمترقبه را کاهش می‌دهد. ضمناً به دلیل انحلال‌پذیری پایین آن در آب، امکان استفاده از آن در محیط‌های مرطوب نظیر انفجارهای زیر آب و حفر چاه‌های عمیق وجود دارد. از این‌رو، این ترکیب به تنهایی یا مخلوط با سایر مواد منفجره در ساخت انواع بمب، نارنجک و پوسته‌های انفجاری به کار گرفته شده و کاربردهای گسترده نظامی و صنعتی دارد [۵و۴و۱].

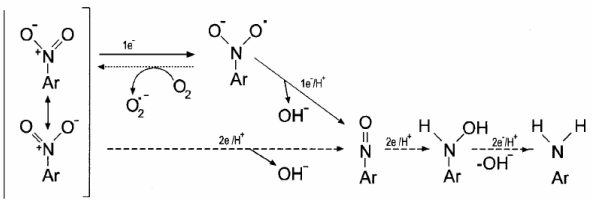
به دلیل اهمیت بحث سلامتی و تهدیدهای زیستی ناشی از ترکیبات شیمیایی ساخته دست بشر، حذف آلاینده‌های زیست محیطی سمی و موتاژن در سال‌های اخیر مورد توجه خاص قرار گرفته است. اساساً تری‌نیتروتولوئن، سمی‌ترین ماده منفجرهٔ نیتروآروماتیک برای ماهیان، جلبک‌ها و میکروارگانیزم‌ها محسوب می‌شود و تحقیقات نشان می‌دهد که (mg/l)۱ از این آلاینده منجر به ۵۰٪ ممانعت در رشد باکتری *ویبریو فیشری*[1] می‌گردد. ضمناً، این ترکیب به عنوان یک عامل موتاژن شناخته شده است که منجر به نارسایی مغز استخوان می‌شود و همچنین کم‌خونی و نارسایی کبدی از عوارض متداول این ترکیب در میان کارگران کارخانجات مهمات‌سازی می‌باشد [۷و۶]. طبق استاندارد سازمان محیط زیست ایالات متحده، میزان مجاز تری‌نیتروتولوئن در خاک و آب آشامیدنی به ترتیب (mg/kg)۱۶ و (µg/l)۲/۲ است[۸]. بررسی‌ها نشان داده است که آلایندگی تری‌نیتروتولوئن در خاک در مراکز تولید مهمات به دلیل تجمع آن در لاگون‌های دفع پساب به (mg/kg)۱۰۰۰۰۰ می‌رسد. در حالی که فقط مقدار کمی از این آلاینده طی عمل نورکافت در خاک به ترکیبات معدنی تبدیل می‌شود و قسمت عمدهٔ آن تا مدت طولانی در خاک باقی می‌ماند و آلودگی آب‌های زیرزمینی را نیز محتمل می‌سازد [۱۰و۹]. آب و خاک آلوده به ترکیبات منفجره در حال‌حاضر یک دغدغه برای حفظ سلامت عمومی است که تلاش قابل توجهی برای یافتن روش‌های سالم‌سازی اقتصادی را به‌دنبال داشته است [۱]. از روش‌های فیزیکی-شیمیایی متداول در پالایش خاک و آب آلوده به این ترکیبات می‌توان به جذب کربنی، اکسایش شیمیایی و سوزاندن اشاره کرد که به سبب هزینه‌های بالا از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند. به عنوان نمونه جذب کربنی از



شکل ۱- متداول‌ترین ترکیبات نیترو آروماتیک در خاک آلوده به مواد منفجره

1. *Vibrio fischeri*

روش‌های موثر در فاز آب است اما ستون‌های کربن فعال، گران هستند و گرانول‌های مملو از ترکیبات انفجاری بایستی به طور متناوب احیا شوند. همچنین سوزاندن از طریق واکنش‌های کراکینگ و اکسایش در دمای بالا (۷۶۰-۱۷۰۰°C)، علی‌رغم حذف موثر به سبب مصرف بالای انرژی نسبتاً گران، و هزینه عملیاتی آن بالغ بر ۱۲۰۰-۳۵۰ دلار برای هر یارد مکعب است [۱۱و۴]. در مقابل، زیست‌سالم‌سازی که در آن از مکانیزم‌های زیست‌شیمیایی میکروارگانیزم‌ها جهت تجزیه آلاینده‌ها و تولید ترکیبات بی‌ضرر استفاده می‌شود. به دلیل پایین‌بودن هزینه‌های جاری اولیه و عدم نیاز به تجهیزات تخصصی، از روش‌های کارآمد در تصفیه آب و خاک‌های آلوده محسوب می‌شود [۱۳و۱۲]. از جمله میکروارگانیزم‌های موثر در زیست‌سالم‌سازی این آلاینده انواع باکتری‌های هوازی انتروباکتر[1]، *سودوموناس*[2]، *رودکوکوس*[3]، *باسیلوس*[4] و *مایکوباکتریوم*[5] و دو سویه بی‌هوازی *کلستریدیوم*[6] و *دی‌سولفو ویبریو*[7] قابل ذکر است [۱۵و۱۴]. در میان سویه‌های قارچی، قارچ‌های سفید تحت شرایط لیگنولیتیک پتانسیل محدودی در این راستا دارند. اساساً سیستم‌های مختلف زیست‌شناختی ارزیابی شده شامل تبدیل زیست‌شناختی تری‌نیتروتولوئن با احیای متوالی گروه‌های نیترو به آمینو از طریق نیتروز و آمینوهیدروکسیل است، شکل (۲)، که منجر به تولید ترکیبات آمینوتولوئن می‌گردد که در مقایسه با ترکیب اولیه تری‌نیتروتولوئن سمیت کمتری دارند [۱۷و۱۶و۱].



شکل ۲- مکانیزم متداول در فرایند تبدیل زیست‌شناختی تری‌نیتروتولوئن

در بین روش‌های زیست‌سالم‌سازی مطرح در خاک، روش‌های فاز جامد نظیر کمپوست و زراعت، خاک قادر به حذف کامل تری‌نیتروتولوئن در زمان کوتاه نیست؛ به علاوه، در این روش‌ها به دلیل میزان بالای ترکیبات افزودنی مورد نیاز، حجم خاک تحت تیمار کاهش می‌یابد [۱۸]. اما راکتورهای زیستی دوغابی که در آن سوسپانسیون خاک آلوده با آب و مواد مغذی تحت تیمار زیستی قرار می‌گیرد به دلیل افزایش نرخ انتقال جرم و دسترس‌پذیری آلاینده از بازدهی بالاتری برخوردار است [۱۹]. ساختار شیمیایی تری‌نیتروتولوئن به گونه‌ای است که با ترکیبات آلی طبیعی موجود در خاک[8] وارد واکنش می‌شود و در نتیجه دسترس‌پذیری زیستی این آلاینده کاهش می‌یابد، بنابراین استفاده از فاز دوغابی در تیمار زیستی خاک آلوده به تری‌نیتروتولوئن به دلیل کاهش اتصال به ذرات خاک و کمک به توزیع بهتر این آلاینده بازدهی حذف آن را افزایش می‌دهد [۱۴]. در تحقیق حاضر، ابتدا توانایی چندین سویه باکتریایی و قارچی در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن در فاز آب ارزیابی گردیده و سپس توانایی میکروارگانیسم برتر در زیست‌سالم‌سازی یک خاک‌آلوده در فاز دوغابی بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ میکروارگانیزم‌ها و آماده‌سازی مایهٔ تلقیح

در این تحقیق پتانسیل تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن توسط ۷ سویه باکتریایی و قارچی (موثر در حذف زیست‌شناختی ترکیبات حلقوی) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ارزیابی شده است. چهار سویه باکتریایی به کارگرفته شده شامل *سودوموناس پتیدا* (PTCC۱۶۹۴)، *سودوموناس آئروجینوزا*[9] (PTCC۱۳۱۰) و *آلکالیجنس فایکالیس*[10] (PTCC۱۶۲۴)، و نیز یک سویه سودوموناس منزوی شده از خاک آلوده به ترکیبات نفتی می‌باشد. برای تهیه مایه تلقیح باکتریایی، ابتدا محیط کشت مغذی LB[11] تلقیح شده، در دور ۲۰۰rpm و دمای ۳۰°C تا اواسط فاز لگاریتمی رشد، گرماگذاری گردید. سپس محیط کشت در دور ۴۰۰۰rpm و دمای ۴°C

1. *Enterobacter*
2. *Pseudomonas*
3. *Rhodococcus*
4. *Bacillus*
5. *Mycobacterium*
6. *Clostridium*
7. *Desulfovibrio*

8. Humic Substances
9. *Pseudomonas aeroginosa*
10. *Alcaligenes faecalis*
11. *Luria bertani*

سانتریفوژ شد و سلول‌ها پس از شستشو با بافر فسفات و تنظیم چگالی نوری (OD_{600}) روی عدد ۱ به عنوان مایه تلقیح برای آزمایش‌های باکتریایی به کار گرفته شدند. ۳ سویه قارچی به کارگرفته شده شامل *فانروچات کرایزسپوریوم*[1] (PTCC۵۲۷۰)، *پنی‌سیلیوم پورپوروجنوم*[2] (PTCC۵۲۱۲) و *آسپرژیلوس تریوز*[3] (PTCC۵۱۱۸) می‌باشند و مایه تلقیح آنها بعد از ۷ روز اسپورزایی در محیط کشت مغذی PDA[4]، شستشو و شمارش اسپور با سرم فیزیولوژی استریل و هماسیتومتر (با سطح $0/0025mm^2$ و عمق ۰/۱mm)، به صورت سوسپانسیون اسپوری در غلظت 10^8 (اسپور/سی‌سی) تهیه گردید. در کلیه آزمایش‌ها میزان تلقیح باکتریایی ۵٪ است و غلظت نهایی قارچ نیز در محیط کشت 5×10^6 (اسپور/سی‌سی) در نظر گرفته شد.

۲-۲ محیط کشت و شرایط عمیاتی

محیط کشت معدنی در نظر گرفته شده برای سویه‌های باکتریایی شامل (٪): (KH_2PO_4 (۰/۳)، K_2HPO_4 (۰/۷)، NaCl (۰/۰۱)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۰۱)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۰۶) و ($(NH_4)_2SO_4$ (۰/۰۲۵) و برای سویه‌های قارچی شامل (٪): (KH_2PO_4 (۰/۱)، K_2HPO_4 (۰/۰۲)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۰۵)، $CaCl_2$(۰/۰۱)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۰۰۲) و $(NH4)_2SO_4$ (۰/۰۵) می‌باشد . ضمناً برای هر دو سویه در محیط کشت (ml/l)۳ محلول عناصر ریزمقدار حاوی (mg/l): (H_3BO_3 (۶۱۱)، $MnCl_2$ (۳۸۹)، $CuSO_4.5H_2O$ (۵۶)، $Al_2(Cl)_3.6H_2O$ (۵۶)، $NiSO_4.6H_2O$ (۵۶)، $CoCl_2.6H_2$ (۵۶)، $SnCl_2$ (۲۸) و KI (۲۸) استفاده شده است [۲۱و۲۰]. با توجه به ناکافی بودن این آلاینده به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، سوبستراهای مکمل گلوکز به میزان ۰/۵٪ و ۲٪ و عصاره مخمر ۰/۰۱٪ و ۰/۱٪ به ترتیب به محیط کشت باکتری و قارچ افزوده شده است. ضمناً در بررسی سمیت این آلاینده برای سویه‌های قارچی از محیط کشت جامد حاوی ۰/۱۵٪ آگار و تری‌نیتروتولوئن در غلظت‌های مختلف استفاده شد. کلیه آزمایش‌های فاز آب در ارلن‌های ۲۵۰ml به صورت دوبار تکرار انجام شد و باکتری‌ها و قارچ‌ها به ترتیب در دمای ۳۰ و ۲۸°C و دور ۲۰۰ و ۱۵۰rpm گرماگذاری شدند. در ادامه توانایی تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن در خاک آلوده در کشت لرزان و در فاز دوغابی با غلظت ۲۵(w/v)٪ و به صورت سه بار تکرار در ارلن‌های ۱۰۰ml بررسی شد. لازم به ذکر است که به منظور افزایش زیست‌دسترس‌پذیری این آلاینده در فاز دوغابی به محیط کشت معدنی ۰/۱٪ مادهٔ فعال در سطح تویین۸۰[5] افزوده شده است.

۲-۳ آماده‌سازی ماتریس خاک آلوده به تری‌نیتروتولوئن

در این تحقیق از یک نوع خاک تمیز به نام کائولن[6] تهیه شده از شرکت صنایع خاک چینی ایران استفاده شده است. این خاک ریز دانه فاقد هر نوع ماده آلی است که امکان انجام آزمایش بدون اثر ترکیبات آلی مزاحم را فراهم می‌سازد. در این تحقیق خاک آلوده به تری‌نیتروتولوئن به غلظت (mg/kg)۱۰۰۰ به صورت مصنوعی و به روش انتقال آلاینده با حلال آماده‌سازی شده است. بدین منظور بعد از تهیه محلول (استون- تری‌نیتروتولوئن) با غلظت (mg/l)۱۰۰۰، خاک با مقدار مشخصی از این محلول (۱ سی‌سی به ازای ۱g خاک) مخلوط و بعد از همگن‌سازی و تبخیر استون، زمانی معادل دو هفته جهت افزایش تماس و برقراری تعادل بین آلاینده و خاک در نظرگرفته شد [۲۲و۱۴].

۲-۴ آنالیز تری‌نیتروتولوئن و تعیین مقدار توده‌زیستی

از جمله روش‌های متداول در آنالیز تری‌نیتروتولوئن، روش‌کروماتوگرافی با کارایی بالا و گستره‌ای از روش‌های اسپکتروفتومتری (طیف نورسنجی) است [۲۵-۲۳]. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده است که طیف نورسنجی به روش جنکینز[7] که روشی کم هزینه در آنالیز این ترکیب حلقوی می‌باشد، در مقایسه با کروماتوگرافی، از دقت قابل قبولی برخوردار می‌باشد [۲۸و۲۷]. لذا، در این تحقیق روش طیف نورسنجی جنکینز به منظور تعیین مقدار آلاینده باقیمانده در هر نمونه انتخاب شده است [۲۶و۲۳]. اساس این روش تشکیل آنیون مایل به قرمز جنوسکای[8] طی واکنش تری‌نیتروتولوئن در حضور استون و سولفیت‌سدیم با هیدروکسیدپتاسیم است. روش کار به طور خلاصه شامل افزودن

1. Phanerochaete Chrysosporium
2. Penicillium Purpurogenome
3. Aspergillus Terreus
4. Potato Dextros Agar
5. Tween80
6. Kaolan
7. Jenkins
8. Janwsky

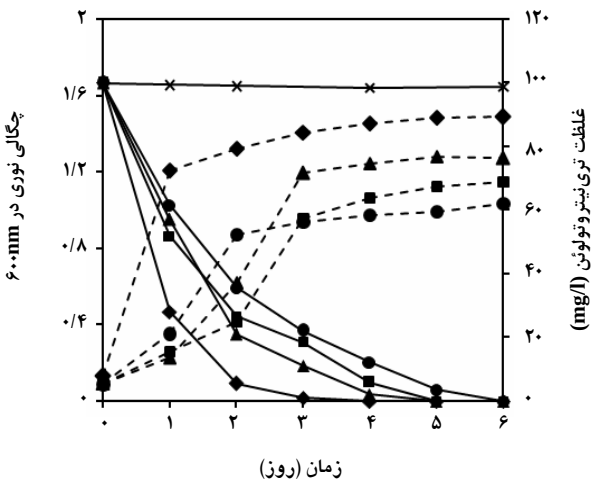
یک پلت هیدروکسیدپتاسیم به اندازهٔ متوسط و ۰/۱g سولفیت‌سدیم به عنوان عامل پایدارکننده محصول واکنش به ۵ml نمونه حاوی استون است که بعد از اختلاط به مدت ۳min و فیلتراسیون جهت حذف ترکیبات مازاد، میزان جذب نور در طول موج ۵۴۰nm با استفاده از طیف نورسنج[1] تعیین می‌شود [۲۳].

جهت تعیین رشد توده زیستی در فاز دوغابی، تحت شرایط استریل ۱ml از دوغاب با آب مقطر استریل در رقت‌های متوالی 10^{-4} تا 10^{-7} رقیق‌سازی شد. بعد از توزیع ۰/۱ml از هر نمونه در سطح پلیت نوترینت آگار و گرماگذاری به منظور رشد و ظهور کلنی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C، شمارش کلنی انجام شد [۲۹]. در فاز آب نیز رشد توده زیستی به روش غیرمستقیم کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰nm اندازه‌گیری شده است.

۳- بحث و بررسی نتایج

۳-۱ تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن در فاز آب و انتخاب میکروارگانیزم برتر

به منظور مقایسه توانایی سویه‌های باکتریایی منتخب در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن ، آزمایش‌های اولیه در فاز آب در حضور ۱۰۰(mg/l) از این آلاینده، معادل با انحلال‌پذیری آن، انجام شد. نتایج مربوط به غلظت‌های توده سلولی و آلاینده در شکل (۳) حاکی از رفتار متفاوت چهار باکتری است در حالی که میزان تبدیل‌زیستی همسو با رشد توده‌زیستی افزایش یافته است. نتایج تایید می‌کند که سویه باکتریایی *سودوموناس پتیدا* بالاترین رشد را معادل با چگالی نوری ۱/۲ طی ۲۴ ساعت دارد و این در حالی است که چگالی نوری سایر سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش طی این مدت به کمتر از ۰/۵ می‌رسد. در میان سویه‌های باکتریایی بررسی شده در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن، *سودوموناس پتیدا* با کاهش سریع غلظت این آلاینده طی ۴۸ ساعت اول و تبدیل کامل آن طی ۳ روز به عنوان سویه برتر شناخته شد. طی این مدت میزان تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن توسط *آلکالیجنس فایکالیس*، *سودوموناس آئروجینوزا* و سویه *سودوموناس* منزوی شده، از ۷۸٪ تجاوز نمی‌کند و تبدیل کامل نیازمند زمانی بیش از ۳ روز (۴ تا ۶ روز) است. مقایسه نرخ تبدیل‌زیستی این آلاینده توسط *سودوموناس پتیدا* با سویه‌های باکتریایی در مطالعات گذشته تایید می‌کند که این گونه در مجموعه میکروارگانیزم‌های با پتانسیل بالا در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن جای دارد [۳۱و۳۰و۱۴].

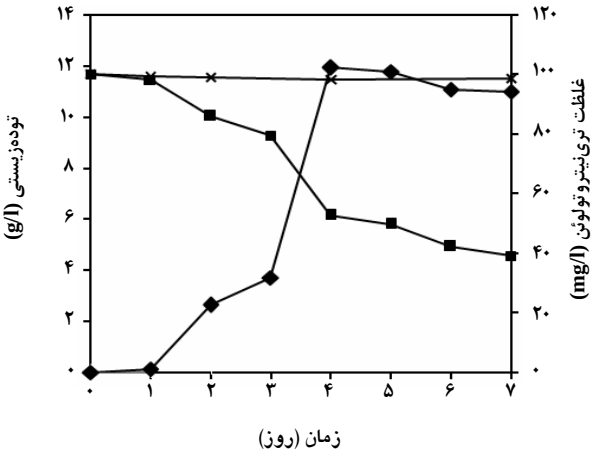


شکل۳- مقایسه روند رشد سویه‌های مختلف باکتریایی (---) و تغییرات غلظت تری‌نیتروتولوئن (—) در فاز آب، نمادها: (♦) *سودوموناس پتیدا*، (▲) *آلکالیجنس فایکالیس*، (■) *سودوموناس آئروجینوزا*، (●) *سودوموناس* منزوی شده از خاک آلوده به نفت و (×) نمونه شاهد بدون تلقیح میکروبی.

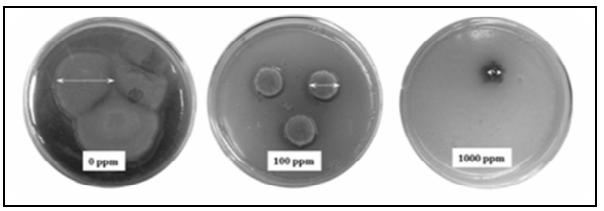
نتایج بدست آمده در مورد قارچ‌های منتخب در محیط حاوی ۱۰۰(mg/l) آلاینده در شکل (۴) نشان می‌دهد که فقط سویه *آسپرژیلوس تریوز* قادر به رشد در حضور این مقدار از آلاینده است در حالی که این غلظت برای سایر سویه‌های قارچی سمیت دارد و مانع رشد آنها گردیده است. میزان تبدیل‌زیستی این آلاینده توسط *آسپرژیلوس تریوز* در مدت ۴۸ ساعت در حدود ۱۴٪ است و این میزان طی ۷ روز سرانجام به ۶۱٪ می‌رسد. ارزیابی نتایج آزمون سمیت تری‌نیتروتولوئن برای این سویه قارچی در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مطابق شکل (۵) تایید می‌کند که افزایش غلظت این آلاینده اثر منفی بر رشد قارچ و فعالیت آنزیمی آن دارد و نهایتاً توانایی این سویه در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن کاهش می‌یابد. بنابراین، نتایج نشان می‌دهند که بازدهی تبدیل‌زیستی این آلاینده در فاز آب توسط قارچ *آسپرجیلوس تریوز* پایین‌تر از سویه‌های باکتریایی مورد بررسی می‌باشد. از آنجا که *سودوموناس پتیدا* در

1. Metertech, SP80001

میان باکتری‌های بررسی شده توانایی بالاتری در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن از خود نشان داده است، این باکتری به عنوان میکروارگانیسم برتر در آزمایش‌های زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده به این آلاینده در فاز دوغابی مورد استفاده قرار گرفته است.



شکل۴- روند رشد قارچ *آسپرژیلوس‌تریوز* (♦) و تغییرات غلظت تری‌نیتروتولوئن در حالت با (■) و بدون تلقیح میکروبی (شاهد)(×) در فاز آب



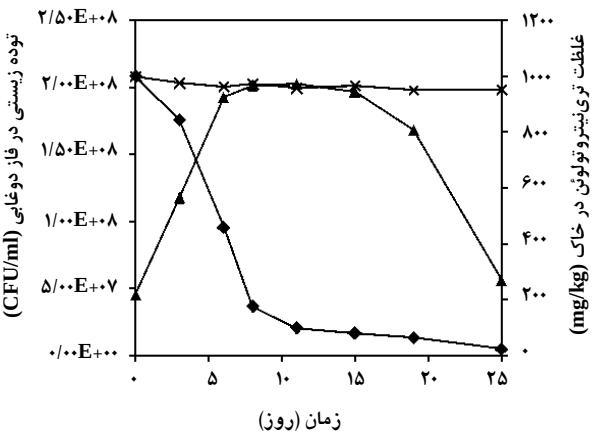
شکل۵- مقایسه میزان رشد قارچ *آسپرژیلوس‌تریوز* در کشت جامد با غلظت‌های مختلف تری‌نیتروتولوئن

۳-۲ زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده به تری‌نیتروتولوئن در فاز دوغابی

در این مرحله به منظور ارزیابی توانایی میکروارگانیزم برگزیده در فاز آب (*سودوموناس پتیدا*) جهت زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده به (mg/kg)۱۰۰۰ تری‌نیتروتولوئن، آزمایش‌های کشت لرزان در فاز دوغابی در غلظت (w/v)٪۲۵ انجام شد. نتایج در شکل (۶) نشان می‌دهند که با افزایش تودهٔ زیستی میزان تبدیل‌زیستی این آلاینده نیز افزایش می‌یابد. در زمان دستیابی به بالاترین مقدار تودهٔ زیستی (2×10^{8} (CFU[1]/ml))، تبدیل زیستی حدود ٪۹۰ حاصل شده است.

1. Colony-Forming Unit

در فازهای سکون و مرگ، نرخ تبدیل‌زیستی آلاینده کاهش می‌یابد و در نهایت، غلظت این آلاینده از مقدار اولیه (mg/kg)۱۰۰۰ طی ۲۵ روز به مقدار متوسط (mg/kg)۲۴ می‌رسد. لازم به ذکر است که تجزیه نمونه شاهد فاقد تلقیح باکتریایی جهت ارزیابی حذف (فیزیکی- شیمیایی) این آلاینده نشان‌دهندهٔ حذفی معادل با ٪۴/۶۳ طی ۲۵ روز است. با توجه به نتایج فوق، باکتری *سودوموناس پتیدا* توانایی چشمگیری در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن در فاز دوغابی دارد. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید تبدیل‌زیستی این آلاینده در فاز دوغابی، بازدهی بالایی دارد و می‌توان پیش‌بینی کرد که تقویت پارامترهای موثر بر رشد این باکتری می‌تواند از عوامل اثرگذار بر افزایش نرخ تبدیل این آلاینده و کاهش مدت انجام فرایند زیست‌سالم‌سازی باشد.



شکل۶- روند تغییرات توده سلولی (▲) و غلظت تری‌نیتروتولوئن در حالت با (♦) و بدون تلقیح میکروبی (شاهد) (×) طی زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده در کشت لرزان دوغابی

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق به منظور انتخاب میکروارگانیزم برتر در زیست‌سالم‌سازی تری‌نیتروتولوئن توانایی ۷ میکروارگانیزم در فاز آب حاوی (mg/l)۱۰۰ از این آلاینده، در کنار گلوکز و عصاره مخمر به عنوان سوبسترای مکمل مقایسه شد. در میان قارچ‌های مورد بررسی تنها سویه *آسپرژیلوس تریوز* (PTCC5118) در برابر سمیت این غلظت از آلاینده از خود مقاومت نشان داد که با این حال طی ۷ روز تنها موفق به تبدیل‌زیستی ٪۶۱ تری‌نیتروتولوئن شده است. در میان

سویه‌های باکتریایی، سویه *سودوموناس پتیدا* (PTCC۱۶۹۴) با توانایی تبدیل‌زیستی کامل این آلاینده طی ۳ روز بر سایر سویه‌ها برتری نشان می‌دهد.آزمایش‌های زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده به ۱۰۰۰ (mg/kg) تری‌نیتروتولوئن توسط *سودوموناس پتیدا* در کشت دوغابی لرزان تایید می‌کند که این سویه توانایی چشمگیری در تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن موجود در خاک دارد و قادر است بیش از ۹۷٪ از این آلاینده را طی ۲۵ روز تبدیل کند. این نتایج تایید می‌کند که زیست‌سالم‌سازی خاک آلوده به این آلاینده در فاز دوغابی از بازدهی بالایی برخوردار است و این روش زیستی می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب در تیمار خاک‌های آلوده به مواد منفجره به کار رود. ضمناً با توجه به اینکه تبدیل‌زیستی تری‌نیتروتولوئن تابع رشد باکتری است، می‌توان پیش‌بینی کرد که تقویت پارامترهای موثر بر رشد این سویه می‌تواند از عوامل اثر گذار بر کاهش مدت تبدیل‌زیستی این آلاینده باشد.

مراجع

[1] T. A. Lewis, D. A. Newcombe, R. L.Crawford, "Bioremediation of soils contaminated with explosives", Journal of Environmental Management, 70, 291-307 ,(2004).

[2] A. Esteve-Nun Ez, A. Caballero, J. L. Ramos, "Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene", Microbiology and Molecular Biology, 65, 335-352 ,(2001).

[3] R. Martel, T. J. Robertson, M. Q. Doan, S. Thiboutot, G. Ampleman, A. Provatas T. Jenkins, "Remediating explosive-contaminated groundwater by in situ redox manipulation (ISRM) of aquifer sediments", Environmental Geology, 53, 1249-1259, (2008).

[4] F. Liu, "Integration of chemical oxidation and biotreatment for removal of TNT from explosives contaminated soil", Department of Chemical Engineering, Mississippi State University, USA, (2003).

[5] R. Boopathy, J. Manning, C. F. Kulpa, "Optimization of environmental factors for the biological treatment of trinitrotoluene-contaminated soil", Environmental Contaminated and Toxicology, 32, 94-98 ,(1997).

[6] G. I. Sunahara, S. Dodard, M. Sarrazin, L. Paquet, G. Ampleman, S.Thiboutot, J. Hawari, A. Y. Renoux, "Development of a soil extraction procedure for ecotoxicity characterization of energetic compounds", Ecotoxicology and Environmental Safety, 39, 185-194, (1998).

[7] T. Frische, "Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria-a case study of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene", Ecotoxicology and Environmental Safety, 51, 133-144, (2002).

[8] US EPA, http://www.Epa.gov/region09/waste/sfund/prg/index.htm, Region IX preliminary remediation goals, (2002).

[9] T. Fernando, J. A. Bumpus, S. D. Aust, "Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*", Applied Environmental Microbiology, 56, 1666–1671 ,(1990).

[10]. G. Ampleman, Defence Research Establishment, Valcartier. Personnal communication, Canada, (1999).

[11] I. Robles-González. F. Fava, H. M. Poggi-Varaldo "A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments", Microbial Cell Factories, 5-7 ,(2008).

[12] C. F. Shen, J. A. Hawari, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, S. R. Guiot, "Explosive biodegradation in soil slurry batch reactors amended with exogenous microorganisms" Water Science and Technology, 43, 291-298 ,(2001).

[13] J. D. Rodgers, N. J. Bruce, "Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives", Water Research, 35, 2101- 2111 ,(2001).

[14] J. T. Popesku, A. Singh, Y. El-Alawi, O. P. Ward, "Trinitrotoluene removal in a soil slurry and soil box systems by an oil-degrading mixed bacterial culture", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 1075-1081, (2006).

[15] E. Duque, A. Haidour, F. Godoy, J. L. Ramos, "Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene", Journal of Bacteriology, 175, 2278-2283 ,(1993).

[16] C. Vorbeck, H. Lenke, P.Fischer, H. Knackmuss, "Identification of a hydride-meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain" Journal of Bacteriology, 176, 932-934, (1994).

[17] B. Lachance, P. Robidoux, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, G. Sunahara, "Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro", Mutatnt Research, 444, 25-39 ,(1999).

[18] USEPA, "Bioremediation of hazardous wastes research, development and field evaluations", EPA/540/R-95/532, (1995).

[19] T. Held, G. Draude, F. R. J. Schmidt, A. Brokamp , K. H. Rais, "Enhanced humification as an in-situ bioremediation technique for 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soils", Environmental Technology, 18, 48-479, (1997).

[20] C. F.Kulpa, R. Boopathy ,J. Manning, "Anaerobic and aerobic transformation of TNT", Department of biological science, University of Notre Dume, Arggone National Laboratory, Shicago,USA,(1996).

[21] R. W. WeberKuhn, H. Anke, "Soil-borne *Penicillium* spp. and other microfungi as efficient degraders of the explosive RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)", Mycological Progress, 2, 83–93, (2003).

[22] U. C. Brinch, F. Ekelundand, C. S. Jacobsen, "Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds", Applied and Enviromental Microbiology, 68, 1808–1816 ,(2002).

[23] T. F. Jenkins, P. W. Schumacher, J. G. Mason, P. G. Thorne, "Analysis for high concentrations of explosives in soil extraction kinetics and dilution procedures", US Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station, Technical Report, Hanover, New Hampshire, (1996).

[24] A. Uzer, E. Ercag, R. Apak, "Selective spectrophotometric determination of trinitrotoluene, trinitrophenol, dinitrophenol and mononitrophenol", Analitica Chemica Acta , 505, 83-93 ,(2004).

[25] J. Yinion, S. Zitrin, "Modern methods and applications in analysis of explosives", Wiley, New York, USA, 1-316 ,(1993).

[26] J. K. Spiker, D. L. Crawford, R. L. Crawford, "Influence of 2,4,6-trinitrotoluene concentration on the degradation of TNT in explosive contaminated soils by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", Applied and Environmental Microbilogy, 3199-3202, (1992).

[27] E. Barth, O. Cincinnati, "Approaches for the remediation of federal facility sites contaminated with explosive or radioactive wastes", Office of Research and Development', U.S. Environmental Protection Agency, Wshington DC, EPA625R-930-13, 8-12, (1993).

[28] K. F. Myers, E. F. McCormick, A. B. Strong, "Comparison of commercial calorimetric and enzyme immunoassay field screening methods for TNT in soil", US Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station, Technical Report, Hanover, New Hampshire, IRRP-94-4, (1994).

[29] T. D. Brock, J. F. Madigan, "Biology of microorganisms", Prentic-Hall, Englewood Cliffs, England, NJ, (1991).

[30] M. Fullerand, J. F. Manning, "Aerobic gram positve and gram negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6- trinitrotoluene", Current Microbiology, 35, 77–83, (1997).

[31] J. Hawari, S. Beaudet, A. Haslaz, S. Thioutot, G. Ampleman, "Microbial degradation of explosives: biotransformation vs mineralization", Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 605–618, (2000).