پاک‌سازی بیولوژیکی خاک آلوده به نیتروفنول در فاز دوغابی با روش افزایش‌زیستی

پانته‌آ پیریه، فرشته نعیم‌پور*

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

پیام‌نگار: **fnaeim@iust.ac.ir**

زمان دریافت: ۱۳۸۸/۶/۲۱

زمان پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

چکیده

پارانیتروفنول از نیتروآروماتیک‌هایی است که به دلیل تولید و استفاده از حشره‌کش‌ها، مواد پلاستیکی و دارویی به محیط زیست وارد شده و خطراتی را ایجاد می‌نماید و لذا حذف این ماده از اهمیت ویژه‌ای برخودار است. در این تحقیق، تجزیه زیستی پارانیتروفنول توسط یک گونه منتخب از میان یک مجموعه میکروبی مورد بررسی قرارگرفته است. طی یک سری آزمایش‌های مقایسه‌ای در فاز آب در میان ۷ گونه مختلف میکروبی، آلکالیجنس فالکالیس[1] با بالاترین سطح تحمل و بیشترین درصد حذف به عنوان باکتری برتر انتخاب گردید. سپس تجزیه پارانیتروفنول در خاک آلوده در دو غلظت ۲۵ و (mgkg-1)۵۰ در فاز دوغابی به مدت ۲۱ روز در کشت-های لرزان مورد بررسی قرار گرفت. پارانیتروفنول باقیمانده در فازخاک نشان می‌دهد که به‌ترتیب ۷۲ و ۵۷ درصد کاهش در غلظت پارانیتروفنول در فاز دوغابی حاصل می‌شود. نتایج، نشان‌دهنده توانایی بالای باکتری فوق در تجزیه‌زیستی پارانیتروفنول جذب شده در خاک می‌باشد.

کلمات کلیدی: ***آلکالیجنس فایکالیس، آسپرجیلوس تریوز***[2]**، زیست سالم‌سازی، خاک آلوده، پارانیتروفنول**

۱- مقدمه

مشتقات فنولی یکی از اجزای اصلی پساب اکثر پالایشگاه‌ها، مجتمع‌های پتروشیمی (در فرآیندهای تقطیر، مواد منفجره، تولید حشره‌کش‌ها، صنایع رنگ‌آمیزی، صنایع تولید چرم و غیره) می‌باشد. مقدار تقریبی مشتقات فنولی در پساب کارخانجات صنعتی با میزان فعالیت‌های بالقوه، شرایط عملیاتی و راهبردهای مدیریتی کارخانجات ارتباط مستقیم دارد [۱]. حضور گروه‌های عاملی بر روی حلقه فنول، به طور مثال عامل نیتروژن‌دار و یا کلردار، باعث افزایش سمیت و ماندگاری این آلاینده در محیط زیست شده و اثرات جبران ناپذیر ژنتیکی بر روی انسان‌ها و دیگر موجودات زنده به همراه دارد. در میان این مشتقات فنولی، نیتروفنول ($C_6H_5NO_3$) به عنوان ماده‌ای که مقدار سمیت آن بسیار بالاست، شناخته شده است و درصورتی که بدن انسان در معرض آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و یا تابش مواد منفجره قرار گیرد به عنوان یک شناساگر زیستی در بدن عمل می‌کند [۲و۱]. این ماده به مقادیر زیاد در ساخت و تولید انواع مواد دارویی مانند استامینوفن و آسپیرین، در ساخت مواد اولیهٔ انواع

1. *Alcaligenes faecalise*
2. *Aspergillus terreus*

حشره‌کش‌ها مانند پاراتیون[1] و متیل پاراتیون، تولید انواع چرم و تیمار آن و همچنین در تولید مواد منفجره کاربرد دارد [۳]. دامنهٔ استفاده از نیتروفنول در صنایع به قدری گسترده است که بین سالهای ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۴ مقدار نیاز کارخانجات ایالات متحده آمریکا به این ماده حدود۲۵- ۲۲/۵ میلیون پوند بوده است [۴]. در نتیجه به علت دامنه وسیع استفاده و توزیع در صنایع، در فهرست آلاینده‌های سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، به عنوان یکی از آلاینده‌های اصلی آب و خاک قرار گرفته که میزان مجاز آن در محیط زیست کمتر از ($10\ (ngl^{-1})$ در نظر گرفته شده است [۵]. مطالعه و بررسی در مورد نیتروفنول نشان داده است که مقدار اندکی از این ماده در بدن باعث اختلال در خون، تولید متاموگلومین، کاهش فعالیت‌های کلیه و کبد، کم خونی و سوزش پوست و چشم می‌شود [۴]. نیتروفنول به عنوان یکی از محصولات فرعی واکنش هیدرولیز پاراتیون، پاراکسون[2]، متیل پاراتیون و دی‌نیتروکروزل[3]، اکسایش نوری مواد منفجره که سطح خاک را آلوده کرده‌اند و همچنین از طریق آلوده شدن آب و خاک به وسیله پساب‌های کارخانجات تولید کننده حشره‌کش‌ها، مواد شیمیایی پلاستیکی، مواد رنگی، مواد دارویی و رنگدانه‌ها و علاوه بر موارد بالا، از طریق باران‌های نیتراته در خاک و آب تجمع می‌کند [۸-۶]. این ماده ممکن است بر روی سطح آب به آسانی شکسته و تجزیه شود اما در عمق خاک نیاز به مدت بسیار طولانی‌تری برای تجزیه شدن دارد که همین عامل باعث آسیب رساندن به موجودات زنده خواهد شد، در نتیجه پاکسازی سریع خاک از این آلاینده بسیار ضروری است [۹].

۱-۱ روش‌های سالم‌سازی خاک آلوده به نیتروفنول

در سال‌های گذشته به منظور انجام فرایند زدایش نیتروفنول از خاک، از روش‌های گوناگون شیمیایی، فیزیکی و حرارتی استفاده شده است که برخی از آنها عبارت‌اند از حفاری و خاک‌برداری، تبخیر، شستشوی خاک، هیدرولیز (آبکافت)، اکسایش شیمیایی پیشرفته و اکسایش نوری [۱۰و۹]. از میان این روش‌ها، شستشوی خاک نسبت به سایر روش‌های سالم‌سازی مناسب‌تر تشخیص داده شده است. اگرچه این روش می‌تواند برای حذف ترکیبات آلی از ذرات بزرگ خاک (ماسه و شن) مورد استفاده قرار گیرد، برای ذرات ریز (سیلت: ۵ تا ۷۵ میکرون) به دلیل داشتن سطح ویژه بالا و جذب بسیار بالا و در نتیجه صرف زمان بسیار طولانی در فرایند سالم‌سازی کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱۱]. بنابراین استفاده از روش‌های فوق با توجه به تعمیر و نگهداری دستگاه‌ها با هزینه‌های بالا، آثار شدید زیست محیطی، تولید محصولات جانبی سمی وکاهش بازدهی زدایش، مورد استقبال قرار نگرفته و اخیراً روش زیستی[4] زدایش (زیست‌سالم‌سازی[5]) در کانون توجه محققین قرارگرفته است [۹]. زیست‌سالم‌سازی یک نوع فرایند پاک‌سازی توسط ریزسازواره‌هاست که در آن به کمک ریزسازواره‌ها (باکتری، قارچ، مخمر و...) می‌توان آلاینده‌های موجود در خاک و آب را به مواد غیرسمی یا با سمیت کمتر تبدیل کرد [۱۲]. دو روش برای به کارگیری ریزسازواره‌ها جهت زیست سالم‌سازی وجود دارد که عبارت است از تحریک‌زیستی[6] و افزایش‌زیستی[7]. در روش اول، رشد ریزسازواره‌های موجود در محل آلوده، با افزودن مواد غذایی لازم تحریک می‌شود و در روش افزایش‌زیستی میکروب‌های از پیش انتخاب شده، به محل مورد نظر افزوده می‌شوند [۱۳].

۱-۲ زیست سالم‌سازی خاک آلوده به نیتروفنول

مطالعات و تحقیقات فراوانی در زمینه حذف نیتروفنول به روش زیست‌شناختی و افزودن ریزسازواره به آب آلوده به نیتروفنول انجام شده است اما متاسفانه تحقیقات ناچیزی در زمینه باکتری‌های تجزیهٔ کنندهٔ نیتروفنول در خاک صورت گرفته است [۸]. به علت سمیت بالای نیتروفنول برای میکروارگانیسم‌ها بخصوص باکتری‌های متانوژنیک [۱۴] و قارچها [۱۵] در دههٔ اخیر دستکاری‌های ژنتیکی فراوانی بر روی ژنوم ریزسازواره‌ها انجام شده است که سطح تحمل آنها را در برابر سمیت این آلاینده بالا می‌برد. علاوه بر مهندسی ژنتیک، تحقیق و بررسی بیشتر بر روی مسیرهای متابولیکی جدید، کوتاه کردن فرایندهای تکامل تدریجی در حذف آلاینده و تطبیق دادن ریزسازواره‌ها با آلایندهٔ سمی می‌تواند سطح تحمل میکروارگانیسم را در برابر سمیت بالای نیتروفنول افزایش دهد [۲].

1. Parathion
2. Paraoxon
3. Dinitrocresol

4. Biological
5. Bioremediation
6. Biostimulation
7. Bioaugmentation

در جدول (۱) مجموعه‌ای از باکتری‌های مختلفی که توانایی حذف نیتروفنول را در خاک داشته‌اند، گرداوری شده است.

فرآیند زیست‌سالم‌سازی خاک‌های آلوده به نیتروفنول در دو فاز جامد و دوغابی امکان‌پذیر است. اما زیست سالم‌سازی در فاز خاک عمدتاً به علت محدودیت در انحلال‌پذیری و ظرفیت جذب و کندشدن انتقال آلاینده به فاز مایع، بازدهی نسبتاً کمی دارد. بنابراین، در مورد آلاینده‌هایی که به سختی تجزیه می شوند از جمله آفت‌کش‌ها، آروماتیک‌های نیترودار (نیتروفنول) و ناجور حلقه‌ها، زیست سالم‌سازی در فاز دوغابی کارایی بالاتری از خود نشان داده است که این افزایش بازدهی در نتیجه تماس بهتر آلاینده و ریزسازواره می‌باشد [۱۷و۱۶]. تاکنون تحقیقات اندکی در مورد زیست سالم‌سازی خاک‌های آلوده به نیتروفنول در فاز دوغابی و بررسی میکروارگانیسم‌های مناسب انجام شده است. در تحقیق حاضر، هدف بررسی زیست سالم‌سازی خاک آلوده به پارانیتروفنول توسط گونه میکروبی برتر در میان یک مجموعه میکروبی می‌باشد که در فاز دوغابی، در کشت لرزان در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول ۱- باکتری‌های موثر در حذف نیتروفنول در فاز خاک

ریزسازواره	فاز فرایند زیست‌سالم‌سازی	فرایند انجام شده در راستای افزایش سطح تحمل باکتری	مرجع
آرتروباکترکلروفنولوکیوس[۱]	خاک دوغابی	مهندسی ژنتیک بر روی ژنوم ریزسازواره	[۱۸]
استنوتروفوموناس[۲]	خاک	منزوی شده از لجن فعال	[۱۹]
آرتروباکتر پروتافورمیا[۳]	خاک	مهندسی ژنتیک بر روی ژنوم ریزسازواره	[۲۰]
رال استونیا[۴]	خاک	کموتاکسیس[۵] کردن باکتری	[۲۱]
لجن فعال[۶]	خاک دوغابی	تطبیق‌پذیری[۷] با نیتروفنول	[۲۲]
آرتروباکتر پروتافورمیا	خاک	ثابت نگه داشتن[۸] سلول‌های باکتریایی به وسیله پودر چوب ذرت[۹] (بلال)	[۲۳]
آرتروباکتر پروتافورمیا	خاک	منزوی شده از خاک‌های کشاورزی آلوده شده به پاراتیون و تطبیق‌پذیری باکتری با نیتروفنول	[۸]
اسفینگوموناس[۱۰]	خاک	ایزوله شده از خاک‌های آلوده به پنتاکلروفنول و مهندسی ژنتیک شده	[۲۴]
موراکسلا[۱۱]	خاک	کپسول‌دار کردن[۱۲] در بسترهای کاراجینان[۱۳] و نشان‌دار کردن به وسیله پروتئین‌های فلورسنس	[۲۵]
اسفینگوموناس	خاک	منزوی	[۲۶]
سویه‌های BG و KY	خاک	منزوی	[۲۷]

1- *Arthrobacter chlorophenolicus* A6
2- *Stenotrophomonas* sp
3- *Arthrobacter protophormiae* RKJ100
4- *Ralstonia* sp. SJ98
5- Chemotaxis
6- Activated sludge
7- Adaptation
8- Immobilization
9- Corncob powder
10- *Sphingomonas* sp. UG30
11- *Moraxella* sp. G21
12-Encapsulation
13-Carrageenan beads

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ ریزسازواره‌ها

باکتری‌های *سودوموناس آئرجینوزا*[1] (PTCC 1310)، *سودوموناس پتیدا*[2](ATCC 12633) و یک سویهٔ منزوی شده از سودوموناس از خاک آلوده به نفت، بر اساس تحقیقات انجام شده در راستای حذف نیتروآروماتیک‌ها و *آلکالیجنس فایکالیس* (ATCC 8750) بر اساس توانایی بالایی که در حذف هیدروکربن آروماتیکی فنول دارد به علاوه ۳ گونه قارچی، *پنیسیلیوم پورپورجنم*[3] (PTCC 5212)، *آسپرجیلوس تریوز* (PTCC 5158) و *فانروچات کرایزسپوریم*[4] (PTCC 5270)، به عنوان مجموعه میکروبی مورد بررسی انتخاب شدند.

۲-۲ محیط کشت

ترکیب محیط‌کشت نمک‌های معدنی، مورد استفاده در آزمایش‌های فاز آب توسط ۳ گونه قارچی در جدول (۲) آمده و ترکیب محیط‌کشت نمک‌های معدنی مورد استفاده ۴ گونه باکتریایی قبلا شرح داده شده است [۲۸]. محلول‌های ساخته شده در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. در هر لیتر محیط کشت معدنی، ۳ میلی‌لیتر محلول مواد ریز مقدار موجود است. pH محیط کشت نمکی مورد استفادهٔ باکتری به وسیله سود یک نرمال استریل بر روی ۷ و محیط کشت نمکی مورد استفاده قارچ به وسیله اسید سیتریک استریل ($۲/۵ gl^{-1}$) بر روی ۴/۵ تنظیم گردید.

تمام مواد مورد استفاده در آزمایش‌ها محصول شرکت مرک و با خلوص بالا می‌باشند. در آزمایش‌های فاز آب، پیش از تلقیح محیط کشت[5] غلظت مشخصی از نیتروفنول به عنوان آلاینده افزوده می‌شود. در آزمایش‌های فاز خاک، ۰/۱٪ توین ۸۰ به محیط‌کشت نمک‌های معدنی اضافه می‌گردد.

۲-۳ انتخاب سوش میکروبی برتر در فاز آب آلوده به نیتروفنول

۲-۳-۱ آماده سازی قارچ و انتخاب گونه برتر

در راستای استفاده از ۳ گونه مختلف قارچی، قارچ‌ها ابتدا بر روی پلیت مالت آگار ((g)۲۰ اگار، (g)۲۰ عصاره مالت و (g)۱ عصاره مخمر) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز کشت داده می شوند. در مرحله بعد، اسپورهای تولید شده به وسیله سرم فیزیولوژی استریل (توئین ۸۰: ($۰/۵ gl^{-1}$)، کلرید سدیم: ($۹/۵ gl^{-1}$) شسته شده و در نهایت توسط دستگاه هموسیتومتر شمرده می‌شوند. تمامی آزمایش‌های مربوط به انتخاب قارچ برتر در فاز آب در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری که شامل ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نمکی و ۲×۱۰^{۵} اسپور بر سی‌سی بود، انجام گرفت. تمامی ارلن‌ها در دور (rpm) ۱۵۰ و دمای ۳۳ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند.

جدول ۲- محیط کشت معدنی و محلول مواد ریز مقدار برای قارچ‌ها

محیط کشت	عصاره مخمر	گلوکز	کلرید کلسیم	سولفات منیزیم، ۷آبه	سولفات آمونیم	فسفات هیدروژن پتاسیم	فسفات دی هیدروژن پتاسیم	سولفات آهن، ۷ آبه	
غلظت (gl^{-1})	۱	۲۰	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۲	۱	۰/۰۰۲	
محلول ریزمقدار	اسید بوریک	کلرید منگنز	کلرید کبالت، ۶آبه	سولفات آلومینیم، ۶ آبه	سولفات مس، ۵ آبه	سولفات روی، ۷آبه	سولفات نیکل، ۶ آبه	کلرید قلع	یدید پتاسیم
غلظت (gl^{-1})	۰/۶۱۱	۰/۳۸۵	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۲۸	۰/۲۸

1. *Pseudomonas reruginosa*
2. *Pseudomonas putida*
3. *Penicillium purpurogenome*
4. *Phanerochaete chrysosporium*
5. Mineral Salt Medium

۲-۳-۲ آماده سازی باکتری و تطبیق‌پذیری آن به نیتروفنول و انتخاب گونه برتر

برای تقویت و استفاده از هر ۴ گونه باکتریایی، از کشت ۲۴ ساعته بر روی پلیت نیوترینت آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس استفاده شده است. به دلیل سمیت بالای نیتروفنول، از روش تطبیق‌پذیری برای افزایش توانایی باکتری‌ها استفاده می‌شود [۸]. برای آماده‌سازی مایه تلقیح مناسب، باکتری‌ها در محیط آبگوشت مغذی[1] حاوی (mgl^{-1})۲۰ نیتروفنول تا زمان رسیدن به اواسط فاز لگاریتمی رشد داده شدند. سپس، مایه تلقیحی با چگالی نوری ۱/۲ (در طول موج ۶۰۰nm) با استفاده از محلول نمکی ((gl^{-1})۹/۵ کلریدسدیم) به منظور یکسان‌سازی جمعیت اولیه باکتریایی تهیه گردید. تمام آزمایش‌ها در راستای انتخاب باکتری برتر در فاز آب در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با حجم کاری ۵۰ میلی‌لیتر با میزان ۵٪ مایع تلقیح در دور ۲۰۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز انجام شدند.

۲-۴ آماده سازی ماتریس خاک آلوده

در این تحقیق از یک نوع خاک با نام کائولن استفاده شد. این خاک علاوه بر ریز دانه بودن، دارای واجذبی خودکار بسیار پایین ترکیبات آلی می‌باشد. از سوی دیگر به‌دلیل فقدان مواد آلی در این خاک، مقایسه و اندازه‌گیری غلظت آلاینده و بررسی اثر مواد آلی بر فرایند در شرایطی کنترل شده انجام می‌گیرد. برای آلوده‌کردن ۱۰۰ گرم ماتریس خاک به‌طور مصنوعی به میزان آلایندگی ۲۵ و ($mgkg^{-1}$)۵۰، ابتدا یک محلول (mgl^{-1})۱۰۰۰ از نیتروفنول در استون را آماده کرده و به ترتیب ۲/۵ و ۵ میلی لیتر در حالت اختلاط کامل، به خاک می‌افزایند. در راستای انتقال نیتروفنول به خاک و توزیع یکنواخت آن، خاک آلوده به نیتروفنول به مدت یک هفته در ظروف دربسته قرار داده می‌شود. سپس حلال تبخیر و خاک آلوده به مدت یک ماه نگهداری می‌شود و قبل از استفاده در اتو کلاو استریل می‌گردد.

۲-۵ آزمایش‌های فاز دوغابی

تمام آزمایش‌ها در فاز دوغابی در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری با حجم کاری ۲۰ میلی‌لیتر در دور ۱۰۰rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز انجام شد. برای این منظور به هر ارلن ۵ گرم خاک آلوده به پارانیتروفنول (در دو غلظت ۲۵ و ($mgkg^{-1}$)۵۰) و ۱۴ میلی‌لیتر از محیط نمکی اضافه می‌گردد و حجم‌کاری هر یک از ارلن‌ها با غلظت ۱ میلی‌لیتر مایه تلقیح به ۲۰ میلی‌لیتر رسانیده می‌شود. نمونه‌گیری در فاز خاک در ۱۲روز اول با فاصله زمانی ۶ روزه و سپس تا انتهای دوره آزمایش با فاصله زمانی ۳ روزه انجام می‌گیرد.

۲-۶ روش تجزیه

در آزمایش‌های فاز آب در بخش باکتری، رشد توده سلولی در طول موج ۶۰۰nm توسط دستگاه طیف نورسنج اندازه‌گیری می‌شود. برای اندازه‌گیری مقدار ۴- (نیتروفنول) باقیمانده در هر نمونه، ۳ میلی-لیتر از مایع رویی نمونه سانتریفوژ شده (سرعت ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵دقیقه) را برداشته صاف می‌کنند. سپس pH آن را با سود ۰/۱ نرمال به ۱۲ رسانده و چگالی نوری آن توسط دستگاه طیف نورسنج در طول موج ۴۰۰nm اندازه‌گیری می‌شود. ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت معدنی اولیه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد [۲۹و۴]. در آزمایش‌های بخش قارچ، رشد توسط وزن خشک سلولی اندازه‌گیری می‌شود. برای اندازه‌گیری مقدار نیتروفنول در هر نمونه، ۵ میلی لیتر از محیط کشت در دور ۴۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. سپس مایع رویی آن برای تعیین غلظت نیتروفنول به روش ذکر شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در فاز خاک، ۱ میلی‌لیتر از فاز دوغابی، برای شمارش باکتری، مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای اندازه‌گیری غلظت نیتروفنول باقیمانده در خاک، ابتدا نیتروفنول موجود در نمونه‌ها مطابق قسمت ۲-۷، استخراج و سپس غلظت مانند فاز آب اندازه‌گیری می شود [۲۴].

۲-۷ استخراج نیتروفنول از خاک

برای اندازه‌گیری میزان نیتروفنول باقیمانده در خاک، نمونه‌ها طی دو مرحله با استون اسیدی شده (شامل ۱٪ اسید کلریک ۱ نرمال) به عنوان حلال استخراج می‌شوند. در مرحله اول از ۳ گرم خاک به همراه ۹ میلی‌لیتر حلال به مدت ۱۶ ساعت و در مرحله دوم از ۶ میلی‌لیتر حلال به مدت ۲ ساعت استفاده می‌شود. برای اختلاط از

1. Luria Broth

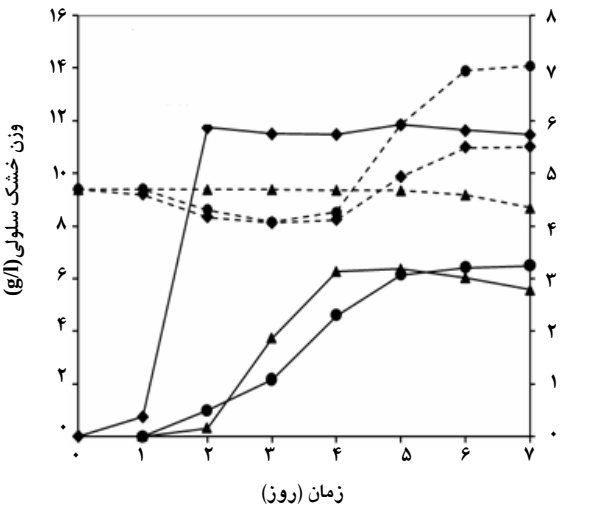
همزن و برای جداسازی فازها از سانتریفوژ به‌ترتیب با دورهای ۲۰۰ و ۴۰۰۰rpm استفاده می‌گردد. در نهایت حلال تبخیر و ۱۰ میلی‌لیتر آب به باقی‌مانده تبخیر اضافه می‌شود [۲۴].

۳- نتایج و بحث

۳-۱ اثر بازدارندگی پارانیتروفنول بر قارچ

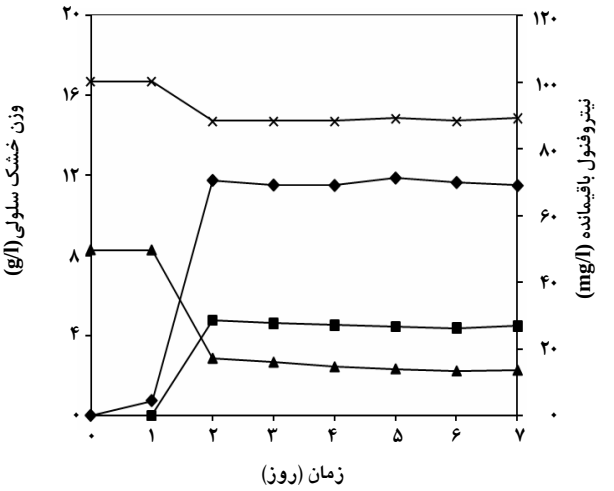
شکل (۱) رشد قارچ‌های مورد استفاده بر روی ($50 mgl^{-1}$) پارانیتروفنول و تغییرات pH محیط کشت را در طول مدت آزمایش نشان می دهد. نتایج نشان می‌دهد که *آسپرجیلوس تریوز* در مدت ۲ روز به بیشترین مقدار رشد خود بر روی پارانیتروفنول می‌رسد در حالی که رشد دو گونه دیگر کمتر است و تقریباً ۲ روز در فاز تأخیر به سر می‌برند. pH محیط کشت رشد *آسپرجیلوس تریوز* از مقدار ۴/۵ به ۵/۵ صعود می‌کند.

مقایسه توانایی رشد و تجزیه‌زیستی پارانیتروفنول توسط گونه قارچی برتر در دو غلظت ۵۰ و ($100 mgl^{-1}$) پارانیتروفنول در شکل (۲) نمایش داده شده است. نتایج نشان می دهد که با اینکه *آسپرجیلوس تریوز* موفق به حذف ۷۰٪ پارانیتروفنول در غلظت ($50 mgl^{-1}$) می‌شود، ولی با افزایش غلظت اولیه پارانیتروفنول به مقدار ($100 mgl^{-1}$) تنها ۱۲٪ کاهش در مقدار پارانیتروفنول مشاهده می‌گردد.



شکل ۱- مقایسه توانایی رشد (▲) *فانروچات کرایزسپوریم*، (◆) *آسپرجیلوس تریوز* و (●) *پنسیلیوم پورپورجنم* و تغییرات pH محیط کشت آنها در حضور ($50 mgl^{-1}$) پارانیتروفنول. رشد سلولی (—)، pH (---)

بنابراین، مشاهدات نشان‌دهندهٔ اثر بازدارندگی پارانیتروفنول و سمیت بالای این ماده در غلظت‌های بالا بر روی *آسپرجیلوس تریوز* می‌باشند. آقای کانالی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ به بررسی کاهش غلظت مشتقات نیتروفنولی توسط یکی از گونه‌های آسپرجیلوس پرداختند و غلظت بازدارندگی آین آلاینده را ($70 mgl^{-1}$) اعلام کردند [۳۰].



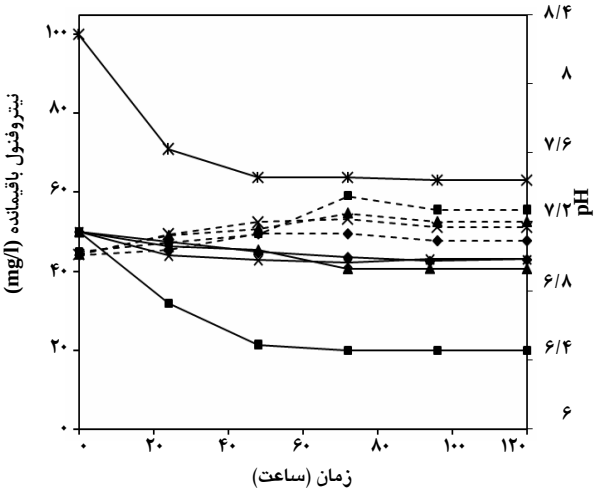
شکل ۲- مقایسه رشد *آسپرجیلوس تریوز* (◆ و ■) و حذف نیتروفنول (▲و ×) در محیط‌های کشت با غلظت‌های اولیه نیتروفنول ۵۰ و ($100 mgl^{-1}$)

۳-۲ اثر بازدارندگی پارانیتروفنول بر روی باکتری

نتایج تجزیه‌زیستی ($50 mgl^{-1}$) پارانیتروفنول توسط ۴ گونه باکتریایی و تغییرات pH محیط کشت در شکل (۳) نشان داده شده است. باکتری *آلکالیجنس فایکالیس* با کاهش ۵۷ درصدی پارانیتروفنول و با بیشترین تغییرات pH به عنوان باکتری برتر شناخته می‌شود در حالی که ۳ گونه دیگر تنها توانایی حذف ۱۸٪ از نیتروفنول موجود در محیط کشت را دارند.

شکل (۳) نشان‌دهندهٔ مقایسه تجزیه‌زیستی پارانیتروفنول در دو غلظت ۵۰ و ($100 mgl^{-1}$) توسط *آلکالیجنس فایکالیس* نیز می‌باشد. اثر بازدارندگی نیتروفنول بر روی *آلکالیجنس فایکالیس* در غلظت ($100 mgl^{-1}$) مشاهده می‌شود با وجود این هنوز هم ۳۸٪ از نیتروفنول پس از ۴۸ ساعت حذف می‌گردد. در نتیجه در راستای بررسی تجزیه زیستی پارانیتروفنول در فاز دوغابی، *آلکالیجنس فایکالیس* به عنوان گونه برتر انتخاب می‌شود. وانگ و همکارانش

نتایج مشابهی در راستای غلظت بازدارندگی نیتروفنول بر روی ریزسازوارهها به دست آوردهاند [۲۲] و کیو و همکارانش نیز هیچ‌گونه تجزیه‌زیستی نیتروفنول را در غلظت‌های بالاتر از (mgl^{-1})۱۰۰ را مشاهده نکرده‌اند [۵].

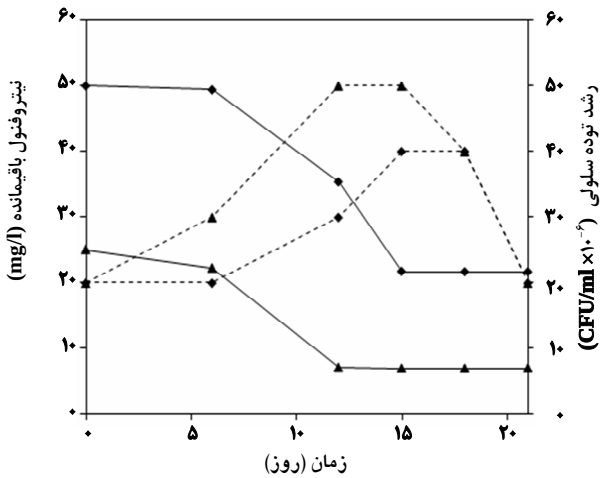


شکل۳- مقایسه تجزیه زیستی پارانیتروفنول(—) و تغییرات pH محیط کشت (---) توسط ۴ گونه مختلف باکتریایی در حضور (mgl^{-1})۵۰ پارانیتروفنول و مقایسه کاهش غلظت نیتروفنول در دو غلظت (■) ۵۰ و (✱) (mgl^{-1})۱۰۰ توسط *آلکالیجنس فایکالیس*. (■) آلکالیجنس فایکالیس، (▲) سودوموناس پتیدا ، (×) سودوموناس آئرجینوزا (◆) یک گونه سودوموناس منزوی شده

۳-۳ بررسی نرخ تجزیه پارانیتروفنول در فاز خاک

در بررسی تجزیه زیستی پارانیتروفنول، میزان کل نیتروفنول موجود در خاک و میزان رشد توده سلولی در طول مدت آزمایش اندازه‌گیری و مقدارنهایی غلظت نیتروفنول برای نمونه‌های آلوده به ۲۵ و ($mgkg^{-1}$)۵۰ پارانیتروفنول به‌ترتیب ۷۲٪ و ۵۷٪ اندازه‌گیری شد. در شکل (۴) رشد توده سلولی بر مبنای شمارش باکتری و نرخ تجزیه باکتری در دو غلظت ۲۵ و ($mgkg^{-1}$)۵۰ گزارش شده است. با افزایش غلظت نیتروفنول، توانایی باکتری به دلیل سمیت کاهش و فاز تأخیر افزایش می‌یابد. مطابق شکل (۴) با افزایش غلظت پارانیتروفنول در خاک، نرخ تجزیه نیز کاهش یافته است.

وانگ و همکارانش (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای بر روی حذف نیتروفنول در دامنه (mgl^{-1})۵۰-۱۰ از خاک دوغابی به وسیله لجن فعال اعلام نمودند که افزایش غلظت نیتروفنول باعث بیشتر شدن فاز تاخیر در فرایند حذف آلاینده و کاهش توان تجزیهٔ باکتریایی می‌شود [۱۲]. آنل و همکارانش (۲۰۰۸) نیز علت این امر را جداکردن گروه‌های فسفریل کننده اکسایشی، که تولید کننده ATP و انرژی در فرایند تجزیه هستند، تاثیر نیتروفنول بر غشای سلولی و خاصیت ضد میکروبی بودن نیتروفنول، اعلام کردند [۱۸].



شکل۴- مقایسه رشد (---) و کاهش غلظت نیتروفنول (—) در فاز دوغابی در حضور (▲)۲۵ و (◆)(mgl^{-1})۵۰ پارانیتروفنول توسط *آلکالیجنس فایکالیس*

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، در میان قارچ‌های انتخابی، *آسپرجیلوس تریوز* به عنوان گونه قارچی برتر در زمینه تجزیه‌زیستی پارانیتروفنول شناخته شد که توانایی حذف مقدار قابل توجهی از نیتروفنول را داراست. اما سطح تحمل این گونه با افزایش غلظت نیتروفنول به (mgl^{-1})۱۰۰ به مقدار زیادی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر *آلکالیجنس فایکالیس* در میان مجموعه باکتریایی منتخب، باکتری مناسبی از نظر توانایی رشد و تحمل مقادیر بالاتر غلظت پارانیتروفنول شناخته شد. در نتیجه به عنوان گونه برتر در تجزیه زیستی پارانیتروفنول در فاز دوغابی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اندازه بسیار ریز و واجذبی بسیار ناچیز، خاک انتخابی باکتری فوق قابلیت بالا و نقش مؤثری در زیست سالم‌سازی این نوع از خاک‌ها از خود نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که هرچه غلظت نیتروفنول افزایش یابد نرخ تجزیه زیستی آن کاهش و فاز تأخیر در منحنی رشد باکتری افزایش می‌یابد. این نتیجه تطبیق خوبی با

نتـایج آنـل، وانـگ و لابانـا در تحقیقـات مـشابه نـشان مـی‌دهـد [۲۲و۱۸و۸].

مراجع

[1] M.C. Tomei, M. Annesini, "4-Nitrophenol biodegradation in a sequencing batch reactor operating with aerobic-anoxic cycles", Environmental Science & Technology, 39, 5059-5065, (2005).

[2] M. Kulkarni , A. Chaudhari, "Microbial remediation of nitro-aromatic compounds", Journal of Environmental Management, 85, 496-512, (2007).

[3] W. Kitagawa, N. Kimura , Y. Kamagata, "A novel p-Nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101", Journal of Bacteriology, 186(15), 4894-4902, (2004).

[4] S. Yi, W. Zhuang, B. Wu, L. Tay, "Biodegradation of p-Nitrophenol by Aerobic Granules in a Sequencing Batch Reactor", Environmental Science & Technology, 40, 2396- 2401, (2006).

[5] X. Qiu, Q. Zhong, M. Li, W. Bai B. Li, "Biodegradation of p-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum*", International Biodeterioration and Biodegradation, 59, 297–301, (2007).

[6] T.L. Sponza, O.S. Kuscu, "P-Nitrophenol removal in a sequential anaerobic migrating blanket reactor (AMBR)/aerobic completely stirred tank reactor (CSTR) system", Process Biochemistry, 40, 1679–1691, (2005).

[7] K. Karim, S. K. Gupta, "Biotransformaintion of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket bioreactor", Bioresource Technology, 80, 179-186, (2004).

[8] S. Labana, O. V. Singh, A. Basu, G. Pandey, R. K. Jain, "A microcosm study on bioremediation of p-nitrophenol-contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100", Microbiol Biotechnol., 68, 417-427, (2005).

[8] J. Zhang, Z. Sun, Y. Li, X. Peng, W. Li Y. Yan, "Biodegradation of p-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity", Journal of Hazardous Materials, 163, 723-728, (2008).

[10] A. Pattanasupong, H. Nagase, M. Inoue, K. Hirata, K. Tani, M. Nasu, K. Miyamoto, "Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 517-522, (2004).

[11] T. Okuda, "Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils", Chemosphere, 68, 281–286, (2007).

[12] A. Singh, O. P. Ward, "Applied bioremediation and phytoremediation", Berlin, Springer, 2, (2004).

[13] A. Perfumo, M. I. Banat, R. Marchant, L. Vezzulli, "Thermally enhanced for bioremediation of hydrocarbon contaminated soils", Chemosphere, 66, 179-184, (2007).

[14] J. Zeyer, P.C. Kearney, "Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by *a pseudomonas putida*", Journal of Agricultural Food and Chemistry, 32, 238–242, (1984).

[15] H. Teramoto, H. Tanaka H. Wariishi, "Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", Microbiol Biotechnol, 66, 312–317, (2004).

[16] I. Allan, K. Semple, A. Reid, "Cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols in contaminated soil slurries", J. Environ. Sci. Technol., 41, 5498-5504, (2007).

[17] O. Rubilar, G. Feijoo, C. Diez, T. A. Lu-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, "Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracophyllum*", Ind. Eng. Chem. Res., 46, 6744-6751, (2007).

[18] M. Unell, K. Nordin, C. Jernberg, J. Stenstrom, J.K. Jansson, "Degradation of mixtures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6", Biodegradation, 19, 495-505, (2008).

[19] Z. Liu, C. Yang, C. Qia, "Biodegradation of p - nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp.", Federation of European Microbiological Societies, 277, 150-156, (2007).

[20] G. Pandey, J. Pandey, k. Jain, "Monitoring *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 in a 'tag and chase' method during p-nitrophenol bioremediation in soil microcosms", Microbial Biotechnol, 70, 757-760, (2006).

[21] D. Paul, R. Singh, K. R. Jain, "Chemotaxis of *Ralstonia* sp.SJ98 towards p-nitrophenol in soil", Environmental Microbiology, 8 (10), 1797-1804, (2006).

[22] J. L. Wang, G. Zhao, L. B. Wu, "Slurry-phase biological treatment of nitrophenol using bioaugmentation technique", Biomedical and enviromental science,18, 77-81, (2005).

[23] S. Labana, G. Pandey, D. Paul, N. Sharma, A. Basu, R. Jain, "Pot and field studies on bioremediation of p-nitrophenol contaminated soil using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100", Environ. Sci. Technol., 39, 3330-3337, (2005).

[24] T. Alber, M. B. Cassidy, R. M. Zablotowiez, J. T. Trevors, H. Lee, "Degradation of p-nitrophenol and Pentachlorophenol Mixture by *Sphingomonase* sp. UG30 in Soil Perfusion Bioreactor", Journal of Industrial and Biotechnology, 25, 93-99, (2000).

[25] D. Errampalli, O. Tresse, H. Lee, J.T. Trevors, "Bacterial survival and mineralization of p-nitrophenol in soil by green fuorescent protein-marked *Moraxella* sp. G21 encapsulated cells", Microbiology Ecology, 30, 229-236, (1999).

[26] M. B. Cassidy, H. Lee, J. T. Trevors, R. B. Zablotowicz, "Chlorophenol and nitrophenol metabolism by *Sphingomonas* sp UG30", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23, 232-241, (1999).

[27] S. Laha, K. P. Petrova., "Biodegradation of 4-nitrophenol by indigenous microbial populations in Everglades soils", Biodegradation, 8, 349-356, (1998).

[28] P. Pirie, F. Naeimpoor, "Investigation on biological treatment of para-nitrophenol contaminated water and the effective factors", First International Conference on Advanced in Wastewater Treatment and Reuse, Tehran University, Iran, (2009).

[29] C.J. Chandekar, A.O. Ingle, "Degradation of p-nitrophenol by a *Pseudomonas* sp. strain PC isolated from sewage", Journal Ind. Pollut. Contr., 6, 11-17, (1990).

[30] A. Kanaly, S. Kim, H. Hur, "Biotransformation of 3-methyl-4-nitrophenol, a main product of the insecticide fenitrothion, by *Aspergillus niger*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6426-6431, (2005).