دانشگاه گیلان
۱۳۵۳_1974

چاپ اول

پیشرفت‌ها در زیست‌پالایی کاربردی

تألیف:

آجی سینگ رامش سی کوهاد اون پی وارد

ترجمه:

دکتر نسرین قربان‌زاده دکترمحمدباقر فرهنگی راستی

استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان

پیشرفت ها در زیست پالایی کاربردی

آجی سینگ رامش سی کوهاد اون پی وارد

دکتر نسرین قربان زاده، دکتر محمدباقر فرهنگی راستی

Advances in Applied Bioremediation

By:

Ajay Singh Ramesh C. Kuhad Owen P. Ward

Translated by:

Nasrin Ghorbanzadeh, Ph. D Mohammad Bagher Farhangi Rasti, Ph. D

University of Guilan Press

9 786001 532412

ISBN: 978-600-153-241-2

بسم الله الرحمن الرحیم

پیشرفت‌ها در زیست پالایی کاربردی

تألیف:

آجی سینگ رامش سی کوهاد اون پی وارد

ترجمه:

دکتر نسرین قربان زاده **دکترمحمد باقر فرهنگی راستی**

استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

انتشارات دانشگاه گیلان

۱۴۰۰

دانشگاه گیلان
۱۳۵۳-1974

شابک: ۲ - ۲۴۱ ـ ۱۵۳ ـ ۶۰۰ ـ ۹۷۸

عنوان و نام پدیدآور	:	پیشرفت‌ها در زیست پالایی کاربردی/تالیف [صحیح: ویراستاران] آجی سینگ، رامش سی کوهاد، اون پی وارد ؛ ترجمه نسیرین قربان زاده، محمدباقر فرهنگی راستی؛ ویراستار علمی فرجاد رفیعی؛ ویراستار ادبی هوشنگ سپهری.
مشخصات نشر	:	رشت: دانشگاه گیلان، ۱۳۹۹.
مشخصات ظاهری	:	۵۲۵ص.: مصور،نمودار.
شابک	:	978-600-153-241-2
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا
یادداشت	:	عنوان اصلی: Advances in applied bioremediation, c2009.
یادداشت	:	کتابنامه.
موضوع	:	زیست‌پالایی
موضوع	:	Bioremediation
موضوع	:	اصلاح‌کننده‌های خاک
موضوع	:	Soil amendments
شناسه افزوده	:	سینگ، آجای، ۱۹۶۳ - م.، ویراستار
شناسه افزوده	:	Singh, Ajay
شناسه افزوده	:	کوهاد، رامش چندر، ویراستار
شناسه افزوده	:	Kuhad, Ramesh Chander
شناسه افزوده	:	وارد، اوئن پی.، ۱۹۴۷ - م.، ویراستار
شناسه افزوده	:	Owen P ,Ward.
شناسه افزوده	:	قربان‌زاده، نسرین، ۱۳۵۷ - ، مترجم
شناسه افزوده	:	فرهنگی راستی، محمدباقر، مترجم
شناسه افزوده	:	رفیعی، فرجاد، ۱۳۵۷ -، ویراستار
شناسه افزوده	:	دانشگاه گیلان
رده بندی کنگره	:	TD۱۹۲/۵
رده بندی دیویی	:	۶۲۸/۵
شماره کتابشناسی ملی	:	۷۵۳۹۵۰۱
وضعیت رکورد	:	فیپا

اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان

نام کتاب	:	**پیشرفت ها در زیست پالایی کاربردی**
مؤلفان	:	**آجی سینگ، رامش سی کوهاد، اون پی وارد**
مترجمان	:	**دکتر نسرین قربان زاده، دکتر محمد باقر فرهنگی راستی**
ویراستار علمی	:	**دکتر فرجاد رفیعی**
ویراستار ادبی	:	**هوشنگ سپهری**
نوبت چـاپ	:	**اول، ۱٤۰۰**
ناشــر	:	**انتشـارات دانشـگاه گیـلان**

هر گونه چاپ و تکثیر صرفاً در اختیار انتشارات دانشگاه گیلان است.*

عنوان **صفحه**

مقدمه نویسندگان ۱

فصل اول: زیست‌پالایی خاک: مروری بر بازار جهانی و فنّاوری‌های موجود

۱-۱- مقدمه..... ۴

۱-۲- بازار جهانی پالایش ۵

۱-۲-۱- آمریکای شمالی ۶

۱-۲-۲- اروپا ۸

۱-۲-۳- استرالیا و نیوزلند..... ۹

۱-۲-۴- آسیا ۱۰

۱-۲-۵- آمریکای لاتین و آفریقا..... ۱۱

۱-۳- مهم‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی..... ۱۲

۱-۴- زیست‌پالایی خاک‌های آلوده ۱۶

۱-۴-۱- زیست‌پالایی در محل ۱۷

۱-۴-۲- زیست‌پالایی در خارج از محل..... ۲۰

۱-۴-۳- نانوفنّاوری و پالایش مکانی: زمینه‌ای نوظهور ۲۲

۱-۴-۴- طراحی پالایش زیستی ۲۳

۱-۵- نتیجه‌گیری ۲۴

منابع.....۲۶

فصل دوم: سود منطقه‌ای، خسارت جهانی: نتیجه هزینه‌ی زیست محیطی اقدامات

۲-۱- مقدمه..... ۳۰

۲-۲- گزینه‌های پالایش بهتر و بدتر..... ۳۰

۲-۲-۱- هیچ کاری نکردن ۳۱

۲-۲-۲- زیست‌پالایی در محل می‌تواند خوب یا بد باشد..... ۳۴

۲-۲-۳- دیگر روش‌های در محل: ساخت مواد ۳۴

۲-۲-۴- حفاری یا غیرمتحرک کردن: سطوح و حمل و نقل ۳۵

۲-۲-۵- دفن ۳۵

۲-۳- مطالعه موردی: دو مدل ساده برای یک ایستگاه پمپ بنزین ۳۶
۲-۳-۱- توضیح مکانی و روش‌های پالایش ۳۶
۲-۳-۲- مدل‌های موردی ۳۷
۲-۳-۳- نتایج موردی ۴۰
۲-۳-۴- نتایج مطالعه موردی ۴۱
۲-۴- بهبود پالایش‌های ویژه ۴۱
۲-۴-۱- موارد قابل توجه ۴۲
۲-۴-۱-۱- انرژی ۴۲
۲-۴-۱-۲- منابع طبیعی کمیاب ۴۲
۲-۴-۱-۳- استفاده از زمین ۴۳
۲-۴-۱-۴- انتشار گازهای گلخانه‌ای ۴۳
۲-۴-۱-۵- در معرض قرار گرفتن انسان ۴۴
۲-۴-۲- ابزار مورد استفاده ۴۴
۲-۵-موارد مورد توجه برای شروع کار ۴۵
۲-۶- جمع‌بندی ۴۶
منابع ۴۷
فصل سوم: فراهمی زیستی آلاینده‌ها در خاک
۳-۱- مقدمه ۵۰
۳-۲- زیست فراهمی در شرایط کنترل ترمودینامیک ۵۵
۳-۲-۱- روابط مربوط به فعالیت ساختاری ۵۵
۳-۲-۲- وابستگی به غلظت ۶۰
۳-۲-۳- رقابت با گونه‌های دیگر در محلول ۶۲
۳-۲-۴- اثر پسماند واقعی ۶۵
۳-۳- فراهمی زیستی در شرایط کنترل سینتیک ۶۸
۳-۳-۱- ماهیت و شکل هندسی محیط پخشیدگی ۷۰
۳-۳-۲- تاثیر ساختار مولکولی ۷۲

۳-۳-۳- مدل‌های تجزیه جذب-میکروبی ترکیب شده ۷۳
۳-۳-۴- مقاومت بالای واجذب ۷۶
۳-۳-۵- همبستگی مقاومت واجذب با مقاومت تجزیه زیستی ۷۸
۳-۳-۶- عوامل مقاومت بالای واجذب ۸۱
۳-۳-۷- فراهمی زیستی تسهیل شده ۸۳
۳-۴- نتیجه‌گیری ۸۸
منابع..... ۹۰
فصل چهارم: سورفکتنت‌های زیستی در زیست‌پالایی
۴-۱- مقدمه.....۱۰۴
۴-۲- تاریخچه طبیعی سورفکتنت‌های زیستی.....۱۰۵
۴-۲-۱- ویژگی‌ها و طبقه‌بندی سورفکتنت زیستی ۱۰۵
۴-۲-۲- ویژگی شیمیایی سورفکتنت زیستی.....۱۰۶
۴-۲-۳- نقش‌های فیزیولوژیکی سورفکتنت‌های زیستی ۱۱۰
۴-۳- کاربردهای سورفکتنت زیستی در زیست‌پالایی ۱۱۵
۴-۳-۱- اثرهای انتقال جرم در زیست‌پالایی.....۱۱۸
۴-۳-۲- شستشوی خاک ۱۲۰
۴-۳-۳- تولید سورفکتنت زیستی.....۱۲۲
۴-۴- نتیجه‌گیری ۱۲۴
منابع.....۱۲۵
فصل پنجم: تنوع منواکسیژناژهای دی-آهن محلول با کاربردهای زیست‌پالایی
۵-۱- مقدمه.....۱۳۴
۵-۲-منواکسیژنازهای دی- آهن محلول (SDIMO ها).....۱۳۴
۵-۲-۱-بیوشیمی ۱۳۴
۵-۲-۲-نقش‌های فیزیولوژیکی ۱۳۵
۵-۲-۳-ژنتیک، تنوع و طبقه‌بندی ۱۳۶
۵-۳-کاربردهای مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول در زیست‌پالایی: آلاینده‌ها و رویکردها ۱۳۹

۵-۳-۱-متابولیسم مرتبط با رشد ۱۳۹
۵-۳-۲-کومتابولیسم ۱۴۰
۵-۳-۳-راهکارهایی برای کاربرد میدانی ۱۴۱
۵-۴-نظارت بر جوامع میکروبی ۱۴۲
۵-۴-۱-نمونه‌برداری بر مبنای کشت برای جانداران تجزیه‌کننده ۱۴۲
۵-۴-۲-نمونه‌برداری غیروابسته به کشت برای جانداران تجزیه‌کننده ۱۴۳
۵-۵-نتیجه‌گیری ۱۴۵
منابع ۱۴۶
فصل ششم: پالایش زیستی خاک آلوده
۶-۱- مقدمه ۱۵۲
۶-۲- سلامت خاک ۱۵۹
۶-۳- آلودگی ۱۶۰
۶-۴- گیاهان و گیاه‌پالایی ۱۶۰
۶-۵- تجزیه زیستی ۱۶۳
۶-۶- رایزوسفر ۱۶۶
۶-۶-۱- تراوش‌های ریشه‌ای ۱۶۷
۶-۶-۲- جوامع میکروبی ۱۶۷
۶-۶-۳- ارزیابی غنا و تنوع یک گونه ۱۶۸
۶-۶-۴- پالایش ۱۷۰
منابع ۱۷۳
فصل هفتم: راهبردهای زیست‌پالایی خاک بر اساس استفاده از آنزیم‌های قارچی
۷-۱- مقدمه ۱۸۲
۷-۲- اصول زیست‌پالایی خاک ۱۸۳
۷-۲-۱- تعاریف ۱۸۳
۷-۲-۲- فناوری‌های زیست‌پالایی ۱۸۴
۷-۲-۳- مزیت‌های زیست‌پالایی در مقابل فرایندهای فیزیکو- شیمیایی ۱۸۵

۷-۲-۴- مسیرهای دگرگونی زیستی آلاینده‌های آلی ۱۸۶
۷-۲-۵- زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به فلز.....۱۸۷
۷-۳- رابطه آنزیم‌های قارچی در زیست‌پالایی خاک.....۱۸۸
۷-۳-۱- قارچ‌های رشته‌ای ۱۸۸
۷-۳-۲- اکسیدازهای قارچی ۱۸۹
۷-۳-۲-۱- پراکسیدازها.....۱۸۹
۷-۳-۲-۲- لاکازها.....۱۹۰
۷-۳-۳- مواردی از دگرگونی زیستی ترکیب زیست‌بیگانه به واسطه آنزیم‌های قارچی.....۱۹۳
۷-۳-۳-۱- هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) ۱۹۴
۷-۳-۳-۲- ترکیب‌های نیترو- آروماتیک ۱۹۵
۷-۳-۳-۲- ترکیب‌های فنولی مختل کننده غدد درون ریز ۱۹۷
۷-۳-۴- مهندسی اکسیدازهای قارچی ۱۹۸
۷-۳-۵- مزایای استفاده از آنزیم‌ها در زیست‌پالایی خاک.....۲۰۱
۷-۳-۶- محدودیت‌های استفاده از آنزیم‌ها برای زیست‌پالایی خاک ۲۰۳
۷-۳-۶-۱- غیریکنواختی (ناهمگنی) و دسترسی به آلاینده‌ها در محیط خاک ۲۰۳
۷-۳-۶-۲- رفتار آنزیم‌ها در محیط خاک.....۲۰۴
۷-۳-۶-۳- تولید اکسیدازهای قارچی ۲۰۶
۷-۴- دورنمای پژوهش‌های آینده.....۲۰۷
۷-۴-۱-بهبود توانایی آنزیم‌های طبیعی برای دگرگونی آلاینده‌ها.....۲۰۷
۷-۴-۲- کشف آنزیم‌ها با توانایی جدید یا افزایش یافته ۲۰۸
۷-۵- نتیجه‌گیری ۲۰۸
منابع.....۲۱۰
فصل هشتم: متابولیسم بی‌هوازی و پالایش زیستی خاک‌های آلوده به مواد انفجاری
۸-۱- مقدمه.....۲۲۴
۸-۲- دگرگونی زیستیِ بی‌هوازی ترکیب‌های نیتروآروماتیک ۲۲۵
۸-۳- باکتری‌های کاهنده سولفات ۲۲۶

۸-۳-۱- متابولیسم TNT و سایر ترکیب‌های نیتروآروماتیک توسط باکتری‌های کاهنده سولفات ۲۲۷
۸-۳-۲- زیست‌پالایی TNT در شرایط کاهش سولفات ۲۳۲
۸-۴- زیست‌پالایی خاک آلوده به مواد منفجره: مطالعه موردی ۲۳۸
۸-۴-۱- روش‌های رآکتور دوغاب خاک و زمین‌پالایی ۲۳۸
۸-۴-۲- آنالیزها ۲۳۹
۸-۴-۳- نتایج ۲۴۱
منابع ۲۴۷

فصل نهم: پالایش زیستی آلاینده‌های نفتی

۹-۱- مقدمه ۲۵۴
۹-۲- سرنوشت هیدروکربن‌ها در خاک ۲۵۴
۹-۳- تنوع میکروبی و تجزیه زیستی ۲۵۶
۹-۴- پالایش زیستی ۲۶۰
۹-۵- اصلاح‌کننده‌های تغذیه‌ای و میکروبی ۲۶۲
۹-۶- عوامل اثرگذار بر زیست‌پالایی هیدروکربن ۲۶۴
۹-۷- نتیجه‌گیری ۲۶۷
منابع ۲۶۸

فصل دهم: زیست‌پالایی سفره‌های آب زیرزمینی آلوده به بنزن

۱۰-۱- مقدمه ۲۷۸
۱۰-۲- آنالیزهای یک سفره آب زیرزمینی آلوده به بنزین ۲۷۹
۱۰-۳- شناسایی و جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن ۲۸۲
۱۰-۴- نتیجه‌گیری ۲۸۹
منابع ۲۹۰

فصل یازدهم: پالایش میکروبی فلزها در خاک‌ها

۱۱-۱- مقدمه ۲۹۶
۱۱-۲- نگرانی در مورد فلزها در خاک ۲۹۶

۱۱-۳- برهم‌کنش فلزها در خاک ۲۹۷
۱۱- ۴- روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای پالایش فلزی ۳۰۲
۱۱-۴-۱- حذف فلز ۳۰۲
۱۱-۴-۲- ناپویایی فلز ۳۰۳
۱۱-۴-۳- روش‌های جدید جلوگیری از آلودگی فلز ۳۰۴
۱۱-۵- برهم‌کنش‌های میکروبی با فلزها ۳۰۴
۱۱-۶- دگرگونی‌های میکروبی فلزها ۳۰۵
۱۱-۶-۱- سازوکارهای کمپلکس/ رسوب ۳۰۷
۱۱-۶-۲- سازوکارهای حلالیت فلز ۳۰۸
۱۱-۷- روش‌های پالایش مبتنی بر میکروب در خاک‌های آلوده به فلز ۳۱۱
۱۱-۷-۱- استفاده غیرمستقیم از فعالیت‌های میکروبی ۳۱۱
۱۱-۷-۲- تقویت با ریزجانداران ۳۱۲
۱۱-۷-۳- شستشوی خاک با ریزجانداران و فرآورده‌های جانبی آنها ۳۱۳
۱۱-۷-۴- انتقال ژن و مهندسی ژنتیک ژن‌های مقاوم به فلز ۳۱۴
۱۱-۷-۵- پیامد میکروبی بر گیاه‌پالایی در رایزوسفر ۳۱۴
۱۱-۸- مرزهای جدید در پالایش میکروبی فلز ۳۱۵
منابع ۳۱۶
فصل دوازدهم: دگرگونی فلزها و شبه فلزهای سمی توسط *سودوموناس استوتزری* سویه KC و سیدروفور آن پیریدین- ۲، ۶- بیس (اسید تیوکربوکسیلیک)
۱۲-۱- مقدمه ۳۲۸
۱۲-۲- بررسی واکنش Pdtc با فلزها ۳۳۰
۱۲-۳- ماهیت برهم‌کنش Pdtc با فلزهای سنگین و متالوئیدها ۳۳۲
۱۲-۴- کاهش و رسوب اُکسی‌آنیون‌های سلنیوم و تلوریم ۳۳۴
۱۲-۵- کاهش کروم (VI) با وساطت Pdtc ۳۴۱
۱۲-۶- چشم‌انداز (دیدگاه) بیوتکنولوژی از برهم‌کنش میکروبی با فلزها ۳۴۵
۱۲-۷- نتیجه‌گیری ۳۴۶

منابع.....۳۴۸

فصل سیزدهم: استخراج زیستی (زیست‌استخراجی) ریزجانداران: دیدگاه‌های مولکولی و کاربردها در بیوتکنولوژی و زیست‌پالایی

۱۳-۱- مقدمه.....۳۵۴
۱۳-۲- پویایی فلزی و تولید زهاب اسیدی معدن (AMD).....۳۵۵
۱۳-۳- جنبه‌های مولکولی برهم‌کنش‌های ریزجانداران اسیددوست با کانی‌ها.....۳۵۶
۱۳-۴- ریزجانداران استخراج زیستی و کاربردهای صنعتی آنها.....۳۶۰
۱۳-۵- زیست پالایی محیطی AMD و فلزها با کاربرد ریزجانداران فروشویی زیستی ۳۶۳
۱۳-۵-۱-روش‌های عمومی برای زیست‌پالایی AMD ۳۶۳
۱۳-۵-۳- زیست‌پالایی فلزهای سنگین ۳۶۵
۱۳-۵-۴- زیست‌پالایی آرسنیک ۳۶۷
۱۳-۵-۵- حس‌گرهای زیستی برای نظارت بر زیست‌پالایی آرسنیک و دیگر فلزها: کاربرد ساختارهای ژنتیکی مشتق شده از ریزجانداران استخراج زیستی.....۳۶۹
۱۳-۵-۶- بازیافت ضایعات فلزها برای جلوگیری از آلودگی زیست محیطی ۳۷۲
۱۳-۶- نتیجه‌گیری.....۳۷۲
منابع.....۳۷۴

فصل چهاردهم: پیشرفت‌ها در گیاه‌پالایی و ریشه‌پالایی

۱۴-۱- مقدمه.....۳۸۲
۱۴-۲- نقش رایزوسفر ۳۸۵
۱۴-۲-۱- تراوش‌ها و آنزیم‌های رها شده.....۳۸۶
۱۴-۲-۲- روش‌های استفاده شده در گیاه‌پالایی ۳۸۷
۱۴-۲-۲-۱- آبگیرهای مصنوعی.....۳۸۸
۱۴-۲-۲-۲- دورنمایی از سمیت‌زدایی توسط گیاهان در CWD.....۳۸۸
۱۴-۳- جنبه‌های پژوهشی ۳۸۸
۱۴-۳-۱- کشت درون شیشه‌ی گیاه در پژوهش‌های گیاه‌پالایی.....۳۸۸
۱۴-۳-۱-۱- کشت‌های سوسپانسیون یاخته‌ای و کالوس.....۳۸۹

۱۴-۳-۱-۲- کشت‌های ریشه مویین ۳۸۹
۱۴-۴- روش‌های مهندسی ژنتیک ۳۹۰
۱۴-۴-۱- جلوگیری از آلودگی ۳۹۱
۱۴-۴-۲- جانداران مهندسی ژنتیک شده برای گیاه‌پالایی ۳۹۲
۱۴-۴-۲-۱- روشهای تهیه گیاهان تراریخت ۳۹۲
۱۴-۴-۳- نمونه‌هایی از گیاهان مهندسی ژنتیک شده برای گیاه‌پالایی ۳۹۳
۱۴-۴-۳-۱- افزاش انباشت فلزهای سنگین ۳۹۳
۱۴-۴-۳-۲- گیاهانی با توانایی تقویت شده برای سمیت‌زدایی ترکیب‌های آلی پایدار ۳۹۴
۱۴-۵- سایر روش‌ها برای افزایش کارایی فرایند گیاه‌پالایی ۳۹۶
۱۴-۵-۱- متابولیت‌های ثانویه گیاهان و نقش آنها در گیاه‌پالایی ۳۹۶
۱۴-۵-۲- تاثیر باکتری‌های همزیست ۳۹۶
۱۴-۵-۲-۱- باکتری‌های همزیست تغییریافته‌ی ژنتیکی ۳۹۷
۱۴-۵-۲-۲- هم‌زیستی مایکوریزایی ۳۹۸
۱۴-۵-۲-۳- متاژنومیک و روش‌های مولکولی ۳۹۸
۱۴-۶- نتیجه‌گیری ۳۹۸
منابع ۴۰۱

فصل پانزدهم: گیاه پالایی خاک‌های بیابانی آلوده به نفت

۱۵-۱- مقدمه ۴۱۴
۱۵-۲- خاک‌های بیابانی و آلودگی نفتی ۴۱۴
۱۵-۲-۱- میکروفلور بیابانی نرمال ۴۱۵
۱۵-۲-۲- نفت خام ۴۱۶
۱۵-۲-۳- آلودگی خاک بیابان با نفت ۴۱۶
۱۵-۲-۴- ریزجانداران تغذیه کننده از نفت ۴۱۷
۱۵-۲-۵- پاکسازی خاک بیابانی نفتی ۴۲۰
۱۵-۳- زیست‌پالایی ۴۲۱
۱۵-۴- گیاه‌پالایی با فنّاوری رایزوسفر ۴۲۲

۱۵-۴-۱- محیط رایزوسفر ۴۲۲
۱۵-۴-۲- میکروفلور رایزوسفر ۴۲۴
۱۵-۴-۳- گیاه‌پالایی ترکیب‌های زیست‌بیگانه ۴۲۴
۱۵-۵- روش‌های گیاه‌پالایی برای خاک‌های بیابانی آلوده به نفت ۴۲۶
۱۵-۵-۱- برهم‌کنش نفت با گیاهان ۴۲۶
۱۵-۵-۲- پوشش گیاهی برای مایه‌زنی ۴۲۷
۱۵-۵-۳- پوشش گیاهی برای کوددهی ۴۳۰
۱۵-۶- نتیجه‌گیری ۴۳۳
منابع ۴۳۵
فصل شانزدهم:گیاه‌پالایی فلزهای سنگین: شاخص‌های میکروبی سلامت خاک برای ارزیابی کارایی پالایش
۱۶-۱- شاخص‌های میکروبی سلامت خاک ۴۴۶
۱۶-۲- گیاه‌پالایی فلزهای سنگین ۴۴۹
۱۶-۲-۱- استخراج پیوسته فلزها با گیاهان ۴۵۲
۱۶-۲-۲- استخراج گیاهی القا شده با کلات ۴۵۴
۱۶-۲-۳- پایدارسازی با گیاهان ۴۵۶
۱۶-۳- نتیجه‌گیری ۴۵۸
منابع ۴۶۰
فصل هفدهم: محیط و ابزارها در ریشه‌پالایی و زیست‌پالایی خاک آلوده
۱۷-۱- تکنیک‌های ارزیابی جوامع میکروبی بدون کشت آن‌ها ۴۶۸
۱۷-۱-۱- آنالیز جامعه میکروبی ۴۷۰
۱۷-۱-۲- الکتروفورز ژل با شیب واسرشته کننده ۴۷۱
۱۷-۱-۳- چندشکلی آرایش فضایی تک رشته‌ای ۴۷۲
۱۷-۱-۴- آنالیز DNA ریبوزومی برش خورده تکثیر شده ۴۷۳
۱۷-۱-۵- PCR رونویسی معکوس ۴۷۴
۱۷-۱-۶- قطعه‌بندی مختص باز و طیف‌سنجی جرمی ۴۷۴

۱۷-۱-۷- آنالیز نشانگرهای زیستی لیپدی معرف/ کاوشگرهای اسید نوکلئیک محیطی.....۴۷۴
۱۷-۱-۸- چندشکلی در طول برش‌های محدودالاثر انتهایی ۴۷۵
۱۷-۱-۹- سایر تکنیک‌ها.....۴۷۶
۱۷-۱-۱۰- خطاهای احتمالی روش‌های مولکولی.....۴۷۷
۱۷-۲– تکنیک DGGE و کاربردهای آن ۴۷۹
۱۷-۲-۱- آنالیز تنوع جامعه.....۴۸۴
۱۷-۲-۲- مطالعات پویایی جوامع ۴۸۵
۱۷-۲-۳- نقشه‌برداری جامعه مولکولی در محیط‌های متغیر ۴۸۵
۱۷-۲-۴- تمایز نیچ ۴۸۶
۱۷-۲-۵- تعیین تنوع گونه‌ای ۴۸۶
۱۷-۳- جایگزین‌های آنالیزهای مبتنی بر PCR ۴۸۷
۱۷-۳-۱- ریخت‌شناسی ۴۸۸
۱۷-۳-۲- واکنش کاتالاز ۴۸۸
۱۷-۳-۳- باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی ۴۸۸
۱۷-۳-۴- شناسایی با استفاده از API و Biolog ۴۸۹
۱۷-۳-۵- الحاق دوباره دو رشته DNA ۴۹۰
۱۷-۴- استفاده از توالی 16S rDNA برای آنالیز صرفه‌جویی و فاصله ۴۹۱
۱۷-۴-۱- ویژگی ناحیه 16S ۴۹۳
۱۷-۴-۲- جفت بازهای مشخص ۴۹۴
منابع.....۴۹۵

فصل هجدهم: ابزارهای مولکولی برای پالایش و صحت‌سنجی زیست‌پالایی

۱۸-۱- مقدمه.....۵۰۴
۱۸-۲- تکنیک‌های پُربرون داد در شناسایی جایگاه‌های آلوده ۵۰۵
۱۸-۲-۱- تکنیک‌های انگشت‌نگاری ۵۰۶
۱۸-۲-۲- PCR زمان واقعی.....۵۰۹
۱۸-۲-۳- ریزآرایه‌های DNA.....۵۰۹

۱۸-۲-۴- متاژنومیک ۵۱۲
۱۸-۳- کاربرد تکنیک‌های مولکولی در جایگاه‌های آلوده برای شناسایی جوامع میکروبی و ارزیابی تجزیه زیستی..... ۵۱۵
۱۸-۴- نتیجه‌گیری ۵۱۹
منابع..... ۵۲۰

مقدمه نویسندگان

استفاده از موجودات زنده طبیعی عمدتاً پروکاریوت در خاک برای سم زدایی و بازسازی خاک‌های آلوده ابزارهای موثر، اقتصادی، متنوع و سازگار با محیط زیست برای بازیابی زمین‌های آلوده فراهم کرده است. جوامع میکروبی در خاک توزیع نسبتاً یک‌نواخت در محیط‌های غیرآلوده دارند. در خاک، میکروارگانیسم‌ها ممکن است سازوکارهای مختلفی را برای دست‌رسی به ترکیب‌های جذب شده روی ذرات و رسوبات، و همچنین استفاده از آلاینده‌های نامحلول در آب به کار گیرند، که توسعه حالت‌های تعادل جدید را آسان می‌کند. این سازوکارها ممکن است شیب غلظت ایجاد کنند، باعث تغییر pH ریزمحیط شوند و سبب ترشح آنزیم‌های برون‌یاخته‌ای و تولید سورفکتنت‌ها، امولسیون کننده‌ها، حلال‌ها یا کلات‌کننده‌ها به منظور توزیع (بازپخش) مواد شیمیایی از فاز سیال نامحلول به فاز آبی شوند و تجزیه (تخریب) اجزای جایگزینِ در معرض قرار گرفته را ارتقا دهند. هدف از پالایش خاک نه تنها افزایش تجزیه، دگرگونی، یا سم‌زدایی آلاینده‌ها، بلکه همچنین حفاظت از کیفیت و ظرفیت خاک برای کار در اکوسیستم نیز هست تا کیفیت محیط‌زیست و بهره‌وری زیستی را حفظ نماید.

ارزیابی دقیق این بازار دشوار است، اما بازار بین‌المللی پالایش حدود ۲۵-۳۰ میلیارد دلار آمریکا برآورد شده است. انجام چنین برآوردی چالش‌برانگیز است، زیرا در بسیاری از کشورها شناسایی جامع سایت‌های آلوده انجام نشده است. بازارهای پالایش در هر کشور معمولاً پس از مدنظر قرار دادن و پرداختن به اولویت‌های مدیریت هوا، آب و پسماند، توسعه می‌یابند. به نظر می‌رسد کشورهای ایالات متحده، کانادا، اروپای غربی، ژاپن و استرالیا با تاسیس تعداد زیادی از شرکت‌ها، محصولات و خدمات زیست‌محیطی، بازارهای بین‌المللی غالب برای پالایش باشند. اقتصادهای در حال ظهور در برخی از کشورهای توسعه‌یافته‌تر آسیا، اروپای شرقی و آمریکای لاتین فرصت‌های میان مدتِ بازار پالایش را ارائه خواهند داد.

فرآیندهای پالایش خاک می‌تواند با استفاده از انواع مختلفی از اقدامات مهندسی قابل اجرا در محل، در سطح یا زیر سطح، و خاک های حفر شده انجام شود. فنّآوری‌های پالایش زیستی نیاز به دانش علوم میان رشته‌ای مانند میکروبیولوژی، شیمی، هیدروژئولوژی، مهندسی، علوم خاک و گیاه، زمین شناسی و بوم شناسی دارد. فرآیندهای زیستی معمولاً با هزینه نسبتاً کم انجام می‌شوند و روش‌های پالایش زیستی با موفقیت برای تیمار خاک‌های آلوده، لجن‌های روغنی و آب‌های زیرزمینی آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، حلال‌ها، سموم دفع آفات و سایر مواد شیمیایی استفاده شده است.

این جلد،**"پیشـــرفت‌هایی در زیســـت‌پالایی کاربردی"**، از سری کتاب‌های **زیست شناسی خاک** مجموعـه‌ای از موضـــوعات مربوط به فرآیندهای زیســـتی با تأکید بر کاربرد آنها در پالایش خاک‌های آلوده اســـت. عناوین فصـــل‌ها شـــامل: مروری بر بازار جهانی پالایش خاک و راه‌حل‌های زیســـت‌فنّاوری موجود، فراهمی زیســـتی آلاینده‌ها در خاک، نقش ســـورفکتنت‌های زیســـتی در زیست‌پالایی، متابولیسم

نیتروآروماتیک‌ها، زیســت‌پالایی خاک‌های آلوده به مواد منفجره، تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی، زیســت‌پالایی آب‌خوان‌های آلوده به بنزن، پالایش میکروبی فلزها در خاک، دگرگونی زیســتی فلزهای و شـبه‌فلزها سـمی، میکروارگانیسـم‌های معدن‌کاو زیستی و فنّآوری‌های گیاه‌پالایی، کاربرد مونواکسیژنازهای دی-آهنِ محلول باکتریایی و آنزیم‌های قارچی، و ابزارهای مولکولی پیشرفته برای پایشِ فرآیندهای زیستی در پالایش خاک، است.

متخصـصـان در زمینه میکروبیولوژی محیط‌زیسـت، زیست‌فنّاوری و زیست پالایی، از موسسات مختلف در ســراســر جهان در تهیه این کتاب کمک کرده‌اند. این کتاب بایســتی برای دانش‌جویان، مدرســان و مشـاوران حرفه‌ای در زمینه‌های زیست‌فنّاوری، میکروبیولوژی، بیوشیمی، زیست‌شناسی مولکولی و علوم خاک و محیط زیست مفید باشد.

ما از همکاری و پشـتیبانی همه نویسـندگان و توصـیه‌ها و تشـویق‌های ارزشمند آجیت وارما و جوتا لیندنبورن در طول آماده سازی این جلد سپاسگزاریم.

آجای سینگ کانادا
اُون پی وارد کانادا
رامش سی کوهاد هند

فوریه ۲۰۰۹

فصل اول

زیست‌پالایی خاک: مروری بر بازار جهانی و فنّاوری‌های موجود

Ajay Singh, Ramesh C. Kuhad, and Owen P. Ward

۱-۱- مقدمه

با توجه به طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی، شمار زیادی از آلاینده‌های شیمیایی در محیط زیست منتشر می‌شوند که موجب نگرانی زیاد در رابطه با تاثیر سمیت بالقوه، سرطان‌زایی و امکان انباشت زیستی مواد شیمیایی موجود در خاک در سیستم‌های زنده شده است. اگرچه فعالیت‌های میکروبی خاک بیشترین سهم را در تجزیه آلاینده‌های آلی دارند، سازوکارهای شیمیایی و فیزیکی نیز می‌توانند مسیرهای تغییرشکل قابل توجهی را برای این آلاینده‌ها ایجاد کنند. فرآیندهای پالایشی خاص که برای پاک‌سازی مکان‌های آلوده مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل: کاهش طبیعی غلظت آلاینده[1]، زمین‌پالایی[2]، دپوکردن زیستی[3] یا کمپوست کردن، ایجاد راکتور زیستی دوغابی[4]، تهویه زیستی[5]، استخراج بخار خاک یا رطوبت‌گیری، واجذب حرارتی، سوزاندن، شستن خاک و دفن آن هستند (سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده[6]، ۲۰۰۴).

به طور کلی زیست‌پالایی با استفاده از ریزجانداران و گیاهان به عنوان یک روش مطمئن و ارزان برای حذف آلاینده‌های خطرناک مورد توجه قرار گرفته است. ریزجانداران نقش تسریع کننده اصلی را در تجزیه یا معدنی کردن آلاینده‌های مختلف دارند و در طول فرآیندهای زیست‌پالایی خاک آن‌ها را به فرآورده‌های فرعی غیرسمی تبدیل می‌کنند (ششادری و هایدلبرگ، ۲۰۰۵؛ هد و همکاران، ۲۰۰۶؛گومز و همکاران، ۲۰۰۷). گیاهان نیز با جذب مستقیم آلاینده‌ها، توانایی ذاتی در سمیت‌زدایی بعضی از مواد زیست‌بیگانه[7] در خاک را دارند. گیاهان پس از جذب آلاینده با تغییر شکل متوالی آن با استفاده از آنزیم‌هایی همانند آنزیم‌های سمیت‌زدا در پستانداران، انتقال و تجمع آلاینده را انجام می‌دهند (مک و همکاران، ۲۰۰۸). گیاه‌پالایی، به کمک ریزجانداران رایزوسفری، یک ابزار مهم در فرآیند زیست‌پالایی است. روش‌های گوناگون زیست‌پالایی به عنوان گزینه‌هایی برای اصلاح گروه‌های مختلف از مواد شیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفته است (هیوز و همکاران، ۲۰۰۰). کاهش طبیعی و افزودن عوامل کاهنده به محیط دارای آلاینده به عنوان گزینه‌هایی برای پالایش حلال‌های کلردار، تحریک زیستی برای پالایش حلال‌های کلردارو فنل‌ها، و تهویه زیستی برای هیدروکربن‌های معطر چندحلقه‌ای[8] (PAHs)، و همین‌طور زمین‌پالایی یا کمپوست کردن

1. Natural attenuation
2. Landfarming
3. Biopiling
4. Slurry Bioreactor
5. Bioventing
6. USEPA: United State Environmental Protection Agency
7. Xenobiotics
8. Polycyclic Aromatic Carbons (PAHs)

گزینه‌هایی برای نیتروآروماتیک‌ها، فنل‌ها، هیدروکربن‌های تک‌حلقه‌ای و هیدروکربن‌های معطر چندحلقه‌ای در نظر گرفته شده‌اند (پرینس، ۱۹۹۸؛ میشرا و همکاران، ۲۰۰۱). فرآیندهای راکتور زیستی نیز برای پالایش تمامی مواد شیمیایی ذکر شده در بالا مناسب هستند. بهینه‌سازی شرایط محیطی در فرآیندهای زیست‌پالایی، فعالیت‌های فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی را که در راستای تجزیه زیستی آلاینده‌های هدف طراحی شده‌اند، تضمین می‌کند. عوامل محیطی که بر فعالیت‌های زیستی اثرگذارند شامل: درجه حرارت، pH، اکسیژن، نوع خاک و ماهیت شیمیایی آلاینده برای تجزیه هوازی و پتانسیل اکسایش-کاهش برای تجزیه بی‌هوازی هستند (ون‌هم و همکاران، ۲۰۰۳).

زیست‌پالایی برخی از مواد شیمیایی زیست‌بیگانه رهاسازی شده ممکن است نیازمند ترکیبی از مراحل شیمیایی، فیزیکی و زیستی به منظور افزایش کارایی تخریب آلاینده باشد. از روش ارزیابی خطر که یک روش علمی چند رشته‌ای نوظهور است، برای ارزیابی سلامت و خطرات زیست محیطی ایجاد شده توسط آلاینده‌های شیمیایی استفاده شده است. این ارزیابی‌ها در ابداع برنامه‌های مدیریتی مخاطره محور برای رسیدن به کمترین خطر، کمک کننده هستند. با این وجود، به منظور توسعه یک برنامه فعال پالایشی مقرون به صرفه، نیاز است که یک روش سیستماتیک و علمی سالم برای ارزیابی خطرات مرتبط در یک مکان و شناسایی فنّاوری‌های مناسب پالایش معرفی شود.

۱-۲- بازار جهانی پالایش

درسال ۲۰۰۱، بازار جهانی محیط زیست، هزینه بازسازی مکان‌های آلوده و پالایش مکانی شامل هزینه‌های مدیریت و دفع زباله‌های خطرناک را هزار میلیارد دلار گزارش کرده است (سالنامه آب ماسونز، ۲۰۰۱-۲۰۰۰). بر اساس گزارش‌های کنونی، بازار بین‌المللی برای بخش پالایش در حدود ۳۵-۳۰ میلیارد دلار آمریکا تخمین زده شده است. کاربرد فنّاوری‌های اصلاحی زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی به سرعت در حال گسترش است و با توجه به برآورد انجام شده، تصور می‌شود که تقاضا برای فنّاوری‌های زیستی در سراسر جهان ارزشی در حدود ۱/۵ میلیارد دلار در سال داشته باشد. بخش پالایش خاک دارای یک بازار توانا در کشورهایی مانند ایالات متحده، کانادا، کشورهای اروپای غربی، ژاپن واسترالیا است. کشورهای در حال توسعه‌ی اروپای شرقی، آمریکای لاتین و کشورهای آسیایی بازارهای در حال ظهوری را برای بخش پالایش ارائه می‌دهند. طبعاً، کمیت‌سنجی ارزش این بازارهای در حال ظهور آسان نیست. به ویژه اینکه فهرست جامعی از مکان‌های آلوده در این کشورها ارائه نشده است. بازارهای پالایش معمولاً بعد از پرداختن یک کشور به اولویت‌های هوا، آب و مدیریت ضایعات گسترش می‌یابند. احتمالاً ایالات متحده تنها کشوری است که در آن ارزیابی گسترده‌ای از مکان‌های آلوده به صورت فدرالی انجام شده و پایه و اساس یک طرح بازاریابی خوب

در آن نوشته شده است. در نتیجه، آمار و ارقام بازار برای بسیاری از حوزه‌های تصمیم‌گیری متغیر، محدود و یا غیردقیق هستند.

با این وجود، کسب و کار جهانی پالایش دستخوش فرایند تغییر است و با ظهور علائم مشخصی در راه رسیدن به تکامل است. بسیاری از مکان‌های آلوده در مراحل پسا پالایش[1] هستند و از فنّاوری‌های بهتر و قابل اعتمادتر و از پردازش اطلاعات بیشتر در عملکرد بهره‌مند شده‌اند. بسیاری دیگر از مکان‌های آلوده اساساً برای اجرای فرآیند پالایش ارجح شناخته شده‌اند. واضح است که بسیاری از مکان‌های آلوده، هنوز بایستی به طور رسمی شناسایی، اعلان یا مشخص شوند. البته تغییر در عوامل محرک پالایش هم دیده شده است. تا اواسط دهه ۱۹۹۰، اجرای عملیات پالایش با رعایت مقررات انجام می‌شد و پاک‌سازی ربطی به کاربری بعدی زمین نداشت. اخیراً، توجه زیادی به عمل پالایش و استفاده از ویژگی‌های مورد نظر و همچنین اقتصاد پالایش و مخاطره‌سنجی شده است. تجزیه و تحلیل بازارهای محیط زیست بین‌المللی در زیربخش‌های بعدی به وضوح نشان می‌دهند که رشد قابل توجهی در دهه آینده در بازارهای سراسر جهان رخ خواهد داد. بحث در مورد بازاریابی عمدتاً با توجه به داده‌های CTCS[2] (۲۰۰۲)، گروه دلفی[3] (۲۰۰۳)، AEGIS[4] (۲۰۰۳)، USEPA (۲۰۰۴)، آمار کانادا[5] (۲۰۰۴)، گروه اکولوگ[6] (۲۰۰۵)، سازمان تجارت خارجی ژاپن[7] (۲۰۰۷)، و صنعت کانادا[8] (۲۰۰۸) انجام شده است.

۱-۲-۱- آمریکای شمالی

برآورد کنونی از بازار پالایش مواد خطرناک در آمریکا حدود ۱۲ میلیارد دلار است که ۳۰ درصد از تقاضای جهانی است. بر اساس استانداردهای نظارتی کنونی قابل اجرا در ایالات متحده، حدود یک چهارم از یک میلیون مکان آلوده نیاز به نوعی از پالایش دارند. البته اگر زمین‌های قهوه‌ای[9] (نقاطی که بیشتر به واسطه آلودگی با مواد نفتی قهوه‌ای می‌شوند) را در نظر بگیریم، تعداد مکان‌های آلوده بیشتر از این مقدار خواهد بود. اغلب این مکان‌ها دارای یک یا ترکیبی از رایج‌ترین آلاینده‌ها مانند حلال‌ها، فرآورده‌های نفتی، ترکیب‌های آلی فرار و فلزهای سنگین هستند که ماهیت و غلظت

1. Post-remedial action phase
2. Certified Trade Compliance Specialist
3. Delphi group
4. AIDS Education Global Information Service
5. Statistics Canada
6. EcoLog Group
7. JETRO (The Japan External Trade Organization)
8. Industry Canada
9. Brownfields

آن‌ها، انتخاب فنّاوری پالایش را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این مکان‌های آلوده براساس اینکه چه مؤسسه یا آژانس دولتی مسئول پاک‌سازی و اصلاح آن باشد به هفت دسته تقسیم می‌شوند: سوپرفاند (پرهزینه)[۱]، عملیات اصلاحی RCRA[۲]، و UST[۳] که تحت نظر USEPA هستند و چهار گروه بعدی هم ممکن است تحت نظر وزارت دفاع[۴] (DOD)، وزارت انرژی[۵] (DOE)، سازمان‌های غیر نظامی فدرال و ایالت‌ها باشند (سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۴). اغلب این مکان‌ها علاوه بر راه‌حل‌های نوآورانه‌ی اصلاحی نیاز به همکاری چند جانبه‌ی سهام‌داران متعدد برای پالایش موفق دارند. برنامه سوپرفاند تحت هدایت سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده، بخش‌هایی را که به طور بالقوه مسئول هستند، جهت پالایش مناطق آلوده با اولویت نواحی دارای آلودگی بالا ترغیب می‌کند. به عنوان مثال، بر اساس همین مقررات سازمان حفاظت محیط زیست، ایالات متحده ترتیبی اتخاذ کرده است که شرکت جنرال الکتریک نزدیک به نیم میلیارد دلار برای پاک‌سازی ترکیب‌ها چند کلری بی‌فنیل[۶] (PCBs) در رودخانه هادسون[۷] پرداخت کند.

بر اساس برآورد سازمان حفاظت محیط زیست، در ۳۰ سال آینده تا حدود ۱۰۰ میلیارد دلار برای پروژه UST هزینه خواهد شد. برنامه‌ی توسعه زمینه‌ی قهوه‌ای USEPA [۸] با افزایش پذیرش پاک‌سازی بر پایه‌ی مفهوم استانداردهای مبتنی بر خطر و کاربری محدود زمین در آینده، پالایش و توسعه مجدد مکان‌های صنعتی را ترغیب می‌کند. سازمان حفاظت محیط زیست برآورد کرده که بیش از نیم میلیون زمین قهوه‌ای (مکان قهوه‌ای آلوده با مواد نفتی) در سراسر ایالات متحده وجود داشته باشد. بازار زمین‌های قهوه‌ای به دلیل ایجاد فرصت‌هایی برای همکاری با مالکان و توسعه‌دهندگان یک بازار در حال رشد برای بسیاری از شرکت‌های پالایش هستند.

صنعت محیط زیست کانادا فروش سالیانه‌ی بیش از ۲۰ میلیارد دلار دارد و ۲/۲ درصد به تولید ناخالص داخلی کانادا کمک می‌کند. پالایش به عنوان بخشی از مدیریت ضایعات جامد و خطرناک در نظر گرفته می‌شود که دومین بخش بزرگ (۲۴ درصد) از صنعت محیط زیست کانادا است. براساس برنامه‌های ایالتی مانند طرح سبز محیط زیست کانادا[۹]، که سبب افزایش آگاهی درباره‌ی پالایش اراضی عمومی و تصویر مثبت از سازماندهی/ اجرای مقررات (که بازتابی از USEPA است)

---

1. Superfund
2. Resource Conservation and Recovery Act
3. Underground Storage Tanks
4. Department of Defense
5. Department of Energy
6. Polychlorinated biphenyls
7. Hudson
8. USEPA brownfield development program
9. Environment Canada´s Green Plan

شـده است، انتظار می‌رود که بازار پالایش خاک و آب زیرزمینی در کانادا به یک میلیارد دلار برسد. در حال حاضـر تقاضـا در کانادا برای خدمات پالایش خاک و محصـولات، ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلیون دلار برآورد شـده اسـت. با توجه به تعهد دولت به اختصـاص ۳/۵ میلیارد دلار بودجه در ۱۰ سـال آینده برای پالایش مکان‌های آلوده به صـورت فدرالی، ۵۰۰ میلیون دلار برای مکان‌های آلوده خاص مانند تالاب‌های قیر سـیدنی[1] که موجب نگرانی عمده در کانادا شـده و ۱۵۰ میلیون دلار برای بازسـازی مکان‌های آلوده‌ی شـهری تحت مدیریت اتحادیه‌های شـهرداری کانادا، به نظر می‌رسـد در آینده‌ی نزدیک شاهد رشد بیشتر بازار پالایش در این کشور باشیم.

برآورد شـده که ۳۰۰۰۰ مکان آلوده در کانادا وجود داشته باشد و تقریبا دو سوم این مکان‌ها از نظر اقتصـادی قابلیت پاک‌سـازی و بازیابی دارند. با این وجود، همچنان در مورد وسـعت و تعداد مکان‌های آلوده در کانادا شـبهاتی وجود دارد. همچنین هیچ قانون ملی در مورد اراضـی آلوده برای هماهنگی روش‌های بین حوزه‌ای ایالتی و منطقه‌ای و ایجاد روش‌ها و اسـتانداردهای مشـترک وجود ندارد. آگاهی از مشـکل مکان‌های آلوده و تلاش برای رفع آن‌ها در کانادا در حال رشـد اسـت. بر اسـاس آمار، درآمد کشور کانادا از بازار جهانی محیط زیست برای صادرات خدمات مدیریت ضایعات جامد و خطرناک بیش از ۱/۶ میلیارد دلار است. برای شرکت‌های بزرگ مشاوره‌ی زیست محیطی و مهندسـی درگیر پالایش در کانادا، تقریباً ۳۰-۱۰ درصـد معاملات از طریق بازار صـادرات تامین می‌شود.

۱-۲-۲- اروپا

اگرچه در اروپا فنّاوری‌ها برای پالایش خاک و آب زیرزمینی در مرحله پیشـرفته اسـت، اما اتحادیه اروپا[2] (EC) بر این باور اسـت که برای افزایش رقابت در بازار جهانی و رسیدن به توسعه پایدارتر، به نوآوری در فنّاوری‌های زیسـت محیطی نیاز اسـت. اقدام مشترک اروپایی برای نشان دادن بهره‌وری پالایش خاک و آب زیرزمینی[3] (EURODEMO) ، به عنوان یک سـازمان با بودجه EC تاسـیس شـد تا تحقیقاتی را درباره کاربرد فنّاوری‌های نوین انجام دهد. انتظار می‌رود که EURODEMO اطلاعات جداگانه‌ی هر کشـور را گرد هم آورده و اعتماد بیشـتری در فنّاوری‌های پالایش و مبنایی برای نوآوری ایجاد کند (اسپیرا و همکاران، ۲۰۰۶).

بازار محیط زیسـت در اروپای غربی حدود ۲۲۷ میلیارد دلار تخمین زده شده است. پیش بینی می‌شـود که بیشـترین سرعت رشد در منطقه مربوط به بخش‌های مدیریت ضایعات، مشاوره زیست

1. Sydney Tar Ponds
2. European Commission
3. European Design Engineering Methodology for Organizations

محیطی، فنّاوری‌های پاک‌تر و انرژی تجدیدپذیر باشد. بیش از ۶۰۰۰۰۰ مکان آلوده در اروپای غربی تخمین زده شـــده اســـت که هزینه پالایش آن در حدود ۵۰ میلیارد یورو با یک دوره پاک‌ســـازی طولانی اسـت. به احتمال زیاد به طور بالقوه ۱/۵– ۰/۵ درصد از تولید ناخالص داخلی برای پالایش مکان‌های آلوده در سـال مورد نیاز است. در بین کشورهای اروپای غربی، انگلستان، فرانسه و مناطق کم ارتفاع هلند تا به امروز بیشـــترین هزینه را برای پالایش صـــرف کرده‌اند. بازار محیط زیســـت انگلسـتان رشد ۲۱ میلیارد پوندی را تا سال ۲۰۱۰ پیش‌بینی کرده است. آلاینده‌های کلیدی (مثل همه کشـورهای صـنعتی) شـامل هیدروکربن‌ها، آفت‌کش‌ها، رادیو نوکلئیدها، آلودگی موضـعی رها شـده از کارخانه‌های صـنعتی/ زمین، نشـت از مناطق صنعتی یا مدیریت نادرست ضایعات شهری و صنعتی است.

فرصـت‌های کسـب و کار محیط زیسـتی به موازات رشد و رونق اقتصادی که کشورهای اروپای شـــرقی و مرکزی در فاصـــله ســـال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ تجربه کردند، افزایش چشـــم‌گیری یافت. فرصـت‌های سـرمایه‌گذاری قابل‌توجهی در زمینه مدیریت ضـایعات، تصفیه آب و فاضلاب و پالایش اراضی آلوده ایجاد شده است. به طور کلی پیش‌بینی می‌شود که بازارهای زیست محیطی در اروپای مرکزی و شـرقی با نرخ رشـد ۶/۶ درصـدی تا سال ۲۰۱۰ به ۱۵ میلیارد دلار آمریکا برسد. بنابراین کشـورهایی مانند جمهوری چک، اسـلواکی، مجارسـتان، لهسـتان و اسـلوونی که تحولات اقتصادی موفق‌تری را تجربه کرده‌اند، به همین ترتیب نیز نرخ رشـد سـریع‌تری در بازارهای زیسـت محیطی نسبت به کشورهای اروپای شرقی نشان داده‌اند.

۱-۲-۳- استرالیا و نیوزلند

سیاست و قوانین زیست محیطی به خوبی در استرالیا و نیوزلند پیشرفت کرده است و روندی مشابه بازارهای اروپایی در حال ظهور اســـت که شـــامل نیاز به بهبود راندمان مصـــرف منابع، به حداقل رسـاندن ضـایعات و کاهش انتشـار گازهای گلخانه‌ای اسـت. در سـال‌های اخیر اقتصـاد با نرخ رشد سـالانه‌ی ۳ درصـدی به خوبی عمل کرده اسـت. این رشـد در پیش‌بینی‌های بازار محیط زیسـت منعکس شـده که در حدود ۱۳ میلیارد دلار آمریکا در سال ۲۰۱۰ در بخش‌های گسترده‌تری از آب و فاضـلاب، مدیریت ضـایعات و کنترل آلودگی هوا طراحی شـده اسـت. رشـد بیشتر در بخش‌هایی مانند فنّاوری اســـتفاده مجدد از آب، نظارت بر محیط زیســـت، انرژی تجدیدپذیر، مدیریت انرژی، فنّاوری‌های پالایش کننده و رایزنی محیط زیستی در بیش از ۱۰ سال آینده پیش‌بینی شده است.

۱-۲-۴- آسیا

در آسیا تقاضای بالای بازار برای ارزیابی مکانی/ خدمات آزمون خاک و فنّاوری‌های اصلاحی برای آلودگی نفتی، تجزیه PCB، زیست‌پالایی، به ویژه برای فنّاوری‌های در محل[1] که اجازه می‌دهد ساختار سطحی دست نخورده باقی بمانند، ضایعات خطرناک ناشی از پاک‌کننده‌های خشک و ایستگاه‌های پرکردن گاز وجود دارد. بازارهای محیط زیست ژاپن در زمینه‌هایی مانند تصفیه آب و فاضلاب، مدیریت ضایعات و کنترل آلودگی هوا به خوبی رشد و توسعه پیدا کرده است. به طور کلی، بازار محیط زیستی با رشد سالانه ۲ درصدی در حال افزایش است و برآورد شده که تا سال ۲۰۱۰ به ۱۱۳ میلیارد دلار برسد. در ژاپن برآورد شده که تعداد مکان‌های آلوده بیش از ۵۰۰۰۰۰ باشد. انتظار می‌رود بازار پالایش ژاپن تا سال ۲۰۱۰ تا ۳ میلیارد دلار رشد کند و پالایش مکانی و اصلاح آب زیرزمینی رشد چشم‌گیری داشته باشد.

در طول ۳۰ سال گذشته، کشورهای خاورمیانه به واسطه منابع غنی پتروشیمی و درآمدهای مربوط به آن، رشد اقتصادی بی‌سابقه‌ای را تجربه کرده‌اند. عموماً، استانداردهای سلامت و محیط زیست در این مناطق به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به آمریکای شمالی واروپا عقب مانده است. به هر حال، فشارهای زیست محیطی از سوی کشورهای اروپایی و آمریکا که حجم زیادی از نفت خاورمیانه را وارد و مصرف می‌کنند، در حال افزایش است. این فشارها هم به سبب انگیزه‌های مربوط به دستیابی به محیط زیست پایدار جهانی و هم برای حصول اطمینان از حفظ سطح عرضه با توجه به رقابت میان صنایع واقع در کشورهای مختلف است. در نتیجه، اقدامات زیست محیطی ضعیف نتوانست از پس مسأله رقابت برآید. پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۱۰ بازار زیست محیطی در منطقه به ۸ میلیارد دلار برسد که گویای رشد سالانه بیش از ۴ درصد است. پیشرفت‌های قابل توجه در قوانین زیست محیطی و نگرش‌های فرهنگی نسبت به محیط زیست به منظور رسیدن به این رشد مورد نیاز است. کشورهای شرقی و شمال شرقی آسیا مثل مالزی، اندونزی، سنگاپور، فیلیپین، تایلند، کره جنوبی، تایوان و هنگ‌کنگ به سرمایه‌گذاری‌های عمده‌ای در زیرساخت‌های زیست محیطی به منظور کاهش پیامدهای آلودگی بر سلامت عمومی نیازمندند. پیش‌بینی می‌شود بازارهای زیست محیطی در منطقه شرق و شمال شرق آسیا به ۲۷ میلیارد دلار آمریکا در سال ۲۰۱۰ برسد.

شاید رشد جمعیت انسانی و تراکم جمعیت همراه با توسعه اقتصادی، بیشترین پیامد را بر محیط زیست بگذارد. در این خصوص، انتظار می‌رود که دو کشور پرجمعیت یعنی چین با جمعیت حدود ۱/۲۵ میلیارد نفر و هند با جمعیتی نزدیک به ۱ میلیارد نفر که انتظار می‌رود تا سال ۲۰۵۰

---

1. *In-situ*

از چین نیز پیشی بگیرد، بزرگ‌ترین پیامدهای محیط زیستی را داشته باشند. افزون بر این، در حال حاضر این دو کشور به واسطه صنعتی شدن سریع، نرخ رشد اقتصادی سالانه فوق‌العاده‌ای (۱۰-۸ درصد) را تجربه می‌کنند. اقتصاد این دو کشور در چند سال آینده از اقتصاد ایالات متحده به عنوان پیش‌تاز اقتصاد جهان پیشی خواهد گرفت. مانند همه جا، رشد بازار زیست محیطی در این کشورها نیز به واسطه افزایش پیامدهای زیست محیطی مرتبط با رشد اقتصادی، صنعتی شدن سریع و در واقع روش‌های کشاورزی فشرده که شامل کاربرد گسترده کودهای غیرآلی و آفت‌کش‌ها است، به جلو رانده می‌شود. چالش‌های زیست محیطی با وجود جمعیت شهری خیلی زیاد که با سطوح بالای آلودگی شهری همراه شده تشدید می‌شود. برای کاهش پیامدهای منفی زیست محیطی زیرساخت‌های محدودی وجود دارد که به نوبه خود سبب اثراتی جدی بر سلامت انسان، حیوان و افزایش نگرانی‌های مربوط به پایداری محیط زیست در طولانی مدت شده است. توانایی واقعی بخش‌های زیست محیطی در این کشورها شناخته نشده است.

بازار زیست محیطی کنونی در هند، در حدود ۴ میلیارد دلار ارزیابی شده است. از سال ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۰ بازار زیست محیطی چین حدوداً از ۳ میلیارد به ۶ میلیارد دلار رسیده و دو برابر شده است و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۱۰ مجدداً دو برابر شود که بیانگر رشد سالانه بیش از ۸ درصد است. از نظر مقدار، بازار تحت سلطه‌ی پالایش آب و پساب می‌باشد و پس از آن‌ها به ترتیب مدیریت ضایعات، پالایش مکانی و کنترل آلودگی هوا قرار دارند.

۱-۲-۵- آمریکای لاتین و آفریقا

به طور کلی، پیش‌بینی می‌شود که بازار زیست محیطی در آمریکای لاتین از حدود ۹/۷ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۰ به ۱۵ میلیارد دلار تا سال ۲۰۱۰ افزایش یابد که بیانگر رشد سالانه‌ی در حدود ۴/۵ درصد است. حجم فعالیت بازار به پالایش آب و پساب و فعالیت‌های مدیریت پسماند و بخش‌های مرتبط مانند ابزار زیست محیطی و مشاوره زیست محیطی مربوط خواهد شد. بخش‌هایی مانند پالایش اراضی آلوده وکنترل آلودگی دریایی، درحال حاضر، در اولویت‌های بعدی هستند اما فرصت‌هایی دراین زمینه‌ها پیش‌بینی می‌شود که در پنج سال آینده بیشتر ظهور خواهد کرد. اگرچه اجرای قوانین زیست محیطی در این کشورها همچنان محدود است، اما محرک‌های بازار مانند الزام توجه به پیامدهای آلودگی محیط زیست بر سلامت و افزایش کمک‌های مالی اهدایی بین‌المللی برای بهبود محیط زیست در کشورهای توسعه نیافته، قوی هستند.

تخریب محیط زیست یکی از عوامل مهم در محدود کردن پیشرفت اقتصادی در کشورهای شمال و جنوب صحرای آفریقا است. سرمایه‌گذاری قابل‌توجه‌ای در زیرساخت‌های مدیریتی آب و پساب مورد نیاز است. برای نمونه، برآورد شده که بین ۸۰ تا ۱۰۰ میلیارد دلار آمریکا برای خدمات

عمومی آب در ۱۰ سال آینده مورد نیاز باشد. کمک بین‌المللی بخشی از بودجه موردنیاز را تامین خواهد کرد. بیشتر سرمایه‌گذاری‌های زیست محیطی در آفریقا در دهه آینده شامل تامین تجهیزات نسبتاً ساده (از نظر فنّاوری) خواهد بود که در جهت رفع مشکلات زیست محیطی و افزایش سلامت انسان باشد.

۱-۳- مهم‌ترین آلاینده‌های زیست محیطی

گسترش عظیم صنایع شیمیایی و نفتی در قرن بیستم سبب تولید طیف وسیعی از فرآورده‌های شیمیایی برای مصرف روزانه شده است. با توجه به یک برآورد، در حال حاضر بین ۸ تا ۱۶ میلیون گونه ترکیب مولکولی آلی طبیعی یا ساخته شده توسط انسان در زیست‌کره حضور دارند که از آن‌ها تعداد ۴۰۰۰۰ نوع در زندگی روزمره ما غالب هستند (هو و همکاران، ۲۰۰۳).

ازآنجا که بیشتر آلودگی‌ها در خاک و آب زیرزمینی جمع می‌شوند، برخی از ویژگی‌های شیمیایی و زیستی خاک در اثر آلودگی‌ها عمیقاً تغییر یافته و سبب تغییر تنوع زیستی و عملکرد خاک می‌شوند. آلاینده‌های آلی شامل آلکان‌ها، مونوآروماتیک‌ها، ترکیب‌های آروماتیک تک حلقه‌ای و چند حلقه‌ای، هیدروکربن‌های کلردار مانند ترکیب‌های چند کلری بی‌فنیل، نیتروآروماتیک‌ها و ترکیب‌های چند حلقه‌ای نیتروژن‌دارهستند. آلاینده‌های آلی بیشتر به صورت ترکیب‌های پیچیده‌ای از گونه‌های شیمیایی مختلف بوده و به شکل مواد نفتی در مکان‌هایی مانند پالایشگاه‌های نفت، پتروشیمی، ایستگاه‌های گاز، مخازن ذخیره‌سازی و چاه‌های اکتشاف و تولید نفت حضور دارند. مواد شیمیایی هالوژن‌دارمعمولاً در کارخانه‌های تولید مواد شیمیایی، محل‌های مخلوط آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها، ته‌نشست‌های دریایی آلوده، مناطق آموزش آتش‌نشانی، تعمیرگاه‌های خودرو، محل‌های دفن زباله و گودال‌های دفن و همین‌طور مرداب‌ها یا آبگیرهای اکسیدی یافت می‌شوند. آلاینده‌های انفجاری مانند TNT، DNT، RDX و دیگر نیتروآروماتیک‌ها ممکن است در توپخانه‌های نظامی، ته‌نشست‌های دریایی آلوده، چاه‌های تخلیه، محل‌های دفن زباله، مناطق حفاری چاه‌ها و مکان‌های نشت TNT یافت شوند.

مکان‌های آلوده شده به فلزهای سنگین شامل مناطقی که ضایعات باتری‌ها و مواد شیمیایی دفع می‌شوند، ته‌نشست‌های دریایی آلوده، مناطق آب‌کاری فلزها و مناطق آموزش آتش‌نشانی و همچنین محل‌های دفن زباله و گودال‌های دفن هستند. سطوح بیش از حد مواد شیمیایی مربوط به کودهای معدنی افزوده شده به خاک، مانند آمونیاک، نیترات و فسفات، که افزون بر آلودگی خاک، منابع آب و هوا را نیز آلوده می‌کنند، آسیب جدی به محیط زیست می‌رسانند. آلودگی ناخواسته خاک با رادیونوکلئیدها خطر زیست محیطی جدی برای تمامی شکل‌های زندگی است.

مناطق رهاسازی زباله‌های رادیواکتیو و زباله‌های مخلوط، مکان‌های عمده آلاینده‌های رادیونوکلئید هستند.

بازگرداندن مکان‌های آلوده به شرایط پیش از آلودگی بسیار دشوار و اغلب دست نیافتنی است (کوستلنیک و کلارک، ۲۰۰۸). روش‌های کنونی پالایش به طورکامل ضایعات خطرناک را ازبین نمی‌برد، بلکه تنها بر اهمیت آلاینده‌ها متمرکز می‌شود (جدول ۱-۱). از آنجایی که اغلب تصمیم‌های پالایشی بیشتر بر کاهش غلظت آلاینده در راستای کاهش خطر آن بر سلامت انسان و محیط زیست استوار هستند، بنابراین اغلب مقدار آلاینده‌ای که در محل باقی می‌ماند، حتی پس از تأیید قانونی عملیات پالایش زیست محیطی، در بسیاری از مکان‌ها ایجاد مشکل می‌کند. فصل دوم این کتاب به بحثی جامع در رابطه با شایستگی زیست محیطی پالایش خاک با استفاده از دو روش ارزیابی، مدل‌های نرم‌افزاری و نکات و ابزارهایی برای چگونگی بهبود پالایش، به منظور کامل کردن ارزیابی خطر می‌پردازد.

جدول ۱-۱: فنّاوری‌های پالایش خاک

فرآیند پالایش خاک	فنّاوری‌های مشخص	توضیح‌ها
فرآیندهای زیستی	زمین‌پالایی	شامل حفاری خاک و قرار دادن آن به صورت توده‌های ردیفی و تحریک جمعیت میکروبی بومی با تأمین عناصر غذایی، آب، عوامل حجم دهنده و افزایش تهویه با شخم زدن
	زیست‌پالایی خارج از محل[1]	
	دپوکردن زیستی، کمپوست کردن، زیست‌پالایی خارج از محل	شامل حفاری خاک و قراردادن آن در توده‌ها یا هوادهی، و تحریک فعالیت میکروبی به وسیله فراهمی عناصر غذایی، آب، اکسیژن
	راکتور زیستی دوغابی زیست‌پالایی خارج از محل	شامل حفاری خاک و اصلاح در یک فضای محصور مانند مخازن/ راکتورها با تأمین اکسیژن، آب و عناصر غذایی در شرایط کنترل شده به منظور تسریع تجزیه زیستی
	آب شویی زیستی	پاک‌سازی فلز سنگین خاک آلوده با استفاده از باکتری‌های اسیددوست که ترکیب‌های گوگردی کاهش یافته را به اسید سولفوریک اکسید می‌کنند. انجام شده در سیستم آبکی یا آب شویی توده

1. Ex situ

ادامه جدول ۱-۱: فنّاوری‌های پالایش خاک

فرآیند پالایش خاک	فنّاوری‌های مشخص	توضیح‌ها
	زیست‌پالایی افزایش یافته	با ایجاد یک محیط مطلوب برای تحریک جمعیت ریزجانداران بومی یا تلقیح شده قابل دست‌یابی است. سرعت تجزیه زیستی با تحریک زیستی، تقویت زیستی و افزایش سوخت و ساز میکروبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد
	زیست‌پالایی در محل	
	تهویه زیستی	شامل تزریق هوا یا آب برای تأمین اکسیژن و عناصر غذایی در توده آلوده زیرزمینی است.
	زیست‌پالایی در محل	
	پخش کردن زیستی	افزودن هوا/ اکسیژن و عناصر غذایی به منظور افزایش تجزیه زیستی آلاینده‌های آب زیرزمینی، همچنین به طور بالقوه تجزیه زیستی در منطقه غیراشباع را بهبود می‌دهد.
	تجزیه زیستی بی‌هوازی	تجزیه بی‌هوازی آلاینده‌های آلی چند کلری در ته‌نشست‌ها. به طور کلی به وسیله یک فرایند هوازی برای کلرزدایی بعدی آلاینده‌ها ادامه می‌یابد.
	گیاه‌پالایی	از گیاهان عالی برای تجزیه آلاینده‌ها، تثبیت آن‌ها در زمین، انباشت آن‌ها در بافت‌های گیاهی یا رها سازی آن‌ها در جو استفاده می‌شود.
	کاهش طبیعی نظارت شده	روشی که به فرایندهای طبیعی اجازه می‌دهد که در طول زمان غلظت‌های آلاینده‌ها را کاهش دهند. شامل فرایندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی با نظارت دائمی است.
فرآیندهای شیمیایی	عوامل اکسید کننده (اکسیژن، اُزون، اشعه UV، هیدروژن پراکسید، گاز کلر و...)؛ عامل کاهنده (فلزهای آلومینیوم، سدیم و روی، پلی‌اتیلن گلیکول قلیایی و..)	فرآیندهای اکسایش و کاهش می‌توانند طیف وسیعی از آلاینده‌ها شامل ترکیب‌های آلی و فلزهای سنگین را پالایش کنند.
	کلرزدایی	عوامل کاهنده اتم‌های کلر را از مولکول‌های کلردار خطرناک (حشره‌کش‌ها، PCB ها) حذف می‌کنند.

ادامه جدول ۱-۱: فنّاوری‌های پالایش خاک

فرآیند پالایش خاک	فنّاوری‌های مشخص	توضیح‌ها
	استخراج شیمیایی با اسیدهای غیرآلی (اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، اسید نیتریک)، اسیدهای آلی (استیک، تارتاریک، سیتریک)، ترکی‌های کلات کننده (NTA ,EDTA, DTPA)	اسیدهای آلی و معدنی برای کاهش pH خاک آلوده به منظور آزادسازی فلزهای سنگین، استفاده می‌شوند؛ ترکیب‌های کلات کننده به منظور تشکیل کمپلکس‌های فلزی محلول در آب به کار می‌روند.
	استخراج با حلال، با استفاده از حلال‌های آلی	یک حلال آلی با حلالیت بالا نسبت به آلاینده در حجم زیاد با خاک مخلوط می‌شود. حلال بازیافت می‌شود و مورد استفاده دوباره قرار می‌گیرد و آلاینده جمع شده و تغلیظ می‌شود
	عوامل پایدارکننده/تثبیت کننده مانند سیمان پورتلند[1]، خاکستر، سیلیکات‌ها، آهک، رس‌ها و پلی‌مرها	با تبدیل آلاینده‌ها به گونه شیمیایی کم تحرک و یا پیوند آلاینده در ماتریکس نامحلول برای کاهش آب شویی، آلودگی در خاک پایدار می‌شود.
	آسفالت‌کاری	روش دیگر تثبیت کردن استفاده از خاک‌های آلوده به هیدروکربن به عنوان بخشی از ماده مخلوط آسفالت در آسفالت‌کاری معابر است.
فرایندهای فیزیکی	شستن خاک	استفاده از آب یا محلول سورفکتنت و فرایندهای مکانیکی برای سایش و تمیزکاری خاک‌ها
	شستن خاک با جریان سریع سیال	غرقاب کردن خاک آلوده با سیال استخراج‌کننده که سبب حرکت آلاینده‌ها به یک نقطه خاص می‌شود. این روش معمولاً همراه با کربن فعال، تجزیه زیستی یا فرایند پمپ و اصلاح استفاده می‌شود.
	استخراج بخار خاک	گازها و آلاینده‌های آلی فرار یا نیمه فرار از اتمسفر خاک توسط پمپ خلاء خارج می‌شود و همچنین سبب تحریک فرایندهای زیست‌پالایی در منطقه‌ی غیر اشباع می‌شود.

1. Portland cement

ادامه جدول ۱-۱: فنّاوری‌های پالایش خاک

فرآیند پالایش خاک	فنّاوری‌های مشخص	توضیح‌ها
	پالایش الکتروسینتیکی	فرایندی میدانی که در آن مجموعه‌ای از الکترودها در خاک جاسازی می‌شوند و حرکت آلاینده‌ها در منافذ دارای آب به سمت الکترود با الکترولیز، الکترواسموز و الکتروفورز انجام می‌شود.
	طبقه‌بندی مرطوب	شامل دو مرحله است که مرحه اول هم‌زدن شدید ته‌نشست‌ها برای متلاشی کردن ذرات به هم چسبیده و مرحله دوم جداسازی مکانیکی ذرات است.
	محصور کردن	جداسازی فیزیکی و محصور کردن خاک آلوده به وسیله درپوش با نفوذپذیری کم و جدار دوغابی، ملاتی یا دیواره‌های نفوذناپذیر
فرایندهای حرارتی	واجذب حرارتی	گرمادهی تا ۶۰۰ درجه سلسیوس که سبب تبخیر آلاینده‌های فرار می‌شود و سپس حذف آلاینده موجود در گازهای خروجی با متراکم کردن، شستشو، فیلتراسیون و یا تخریب انجام می‌شود.
	سوزاندن	شامل حرارت دادن به خاک حفاری شده تا دمای ۸۸۰ تا ۱۲۰۰ درجه سلسیوس به منظور از بین بردن یا سمیت‌زدایی آلاینده است.
	تبدیل کردن به شیشه	گرمادهی خاک حفاری شده در دمایی بین ۱۰۰۰ تا۱۷۰۰درجه سلسیوس که سبب شیشه‌سازی خاک یا تولید فرآورده براق جامد یکپارچه می‌شود.
	اکسیداسیون مرطوب	فرایند اکسیداسیون که در فاز آبی در دما و فشار بالا اتفاق می‌افتد، اما در زیر دما و فشار فوق بحرانی آب
	اکسیداسیون فوق بحرانی	دما و فشار بالاتر از نقطه‌ی بحرانی آب که سبب حلالیت بیشتر اکسیژن و ترکیب‌های آلی سمی درفاز محلول می‌شود و سرعت اکسیداسیون را بالاتر می‌برد.

۱-۴- زیست‌پالایی خاک‌های آلوده

استفاده از پروکاریوت‌های طبیعی در خاک (در حدود ۴۶۰۰ ژنوم مجزا در یک گرم خاک وجود دارد) برای سمیت‌زدایی و بازسازی خاک‌های آلوده، ابزاری موثر، مقرون به صرفه، نو و سازگار با محیط زیست برای احیای زمین‌های آلوده است (هانتر-سورا، ۱۹۹۸؛ ون‌هام و همکاران ۲۰۰۳). جوامع میکروبی خاک توزیع نسبتاً یکسان در محیط‌های غیرآلوده دارند. فرض بر این است که تنوع میکروبی بالاتر متناسب با افزایش توانایی سوخت و ساز است. از این فرض می‌توان این‌گونه برداشت

کرد که تنوع گونه‌ای زیاد سبب حذف موثرتر متابولیت‌ها و آلاینده‌ها از یک بستر می‌شود. در محیط خاک ریزجانداران ممکن است سازوکارهای مختلفی را به منظور دسترسی به ترکیب‌های جذب شده روی ذرات خاک و ته‌نشست‌ها و همچنین برای استفاده از آلاینده‌های نامحلول در آب به کار گیرند. تسهیل وضعیت تعادلی جدید، ایجاد شیب‌های غلظتی، ایجاد تغییرات pH در محیط‌های کوچک، ترشح آنزیم‌های برون یاخته‌ای، تولید سورفکتنت‌ها و مواد امولسیون کننده، حلال‌ها و کلات کننده‌ها برای جداسازی مواد شیمیایی از فاز غیرمحلول به فاز محلول وتجزیه موادی که با آن مواجه هستند، ازجمله این سازو کارها است (ون‌هام و همکاران ۲۰۰۳؛ سینگ و همکاران ۲۰۰۷). فصل سوم این کتاب بحث‌های جزئی‌تری را در رابطه با شرایط ژئوشیمیایی، روش‌های جذب- تجزیه زیستی مرتبط با هم، ارتباط بخش‌های مقاوم به واجذبی و زیست مقاوم آلاینده و فراهمی زیستی تسهیل شده را عنوان می‌کند. فصل چهارم به تشریح ویژگی شیمیایی سورفکتنت زیستی، نقش‌های فیزیولوژیکی، کاربردها در زیست‌پالایی، و تولید سورفکتنت‌ها در محل و خارج از محل می‌پردازد.

استفاده از گیاهان به منظور انتقال، تجمع و حذف آلاینده‌ها از محیط زیست گیاه‌پالایی نامیده می‌شود. این رویکرد می‌تواند برای مواد زیست‌بیگانه آلی و غیرآلی و آلاینده‌های موجود در خاک، آب و هوا مورد استفاده قرار گیرد. انوع آلاینده‌ها دامنه‌ای از کودهای غیرآلی تا حشره‌کش‌ها، از فلزهای سنگین و یا عناصر رادیواکتیو تا مواد منفجره و از نشت مواد نفتی تا آلاینده‌های آلی مانند PAH ها و PCB ها را شامل می‌شوند.

فنّاوری زیست‌پالایی برای تجدید و بازسازی مکان‌های آلوده ممکن است در محل و یا خارج از محل استفاده شود. در روش پالایش در محل اجازه داده می‌شود که خاک بدون حفاری و انتقال پالایش شود، اما به دوره‌ی زمانی طولانی‌تری نیاز دارد و به دلیل تغییرپذیری در ویژگی‌های خاک‌ها و محیط‌های آبی به نظارت بیشتری نیازمند است. زیست‌پالایی افزایش یافته، گیاه‌پالایی و تهویه زیستی نمونه‌هایی از روش‌های پالایش در محل هستند. پالایش خارج از محل عموماً به دوره زمانی کوتاه‌تری نیاز دارد. اما نیاز به حفاری خاک‌ها و کنترل نظارتی بالا سبب افزایش هزینه‌های مهندسی می‌شود. زمین‌پالایی، دپوکردن زیستی، کمپوست کردن و ایجاد راکتور زیستی دوغابی نمونه‌هایی از پالایش خارج از محل هستند.

۱-۴-۱- زیست‌پالایی در محل

زیست‌پالایی میکروبی پیشرفته با ایجاد یک محیط مناسب برای تحریک جمعیت‌های میکروبی بومی یا تلقیح شده از ریزجانداران و بهره‌برداری از توانایی فروساختی آن‌ها برای رشد و مصرف آلاینده‌ها به عنوان منبع غذا و انرژی حاصل می‌شود. اکسیژنازها از مهم‌ترین آنزیم‌های استفاده شده

به وسیله باکتری‌ها در تجزیه ترکیب‌های آلی هستند. پیشرفت‌های تازه در شناخت تنوع، توزیع و فیزیولوژی منواکسیژنازها در فصل پنجم مورد بحث قرار خواهد گرفت. سرعت تجزیه زیستی یا تغییر شکل زیستی به وسیله نوع و غلظت آلاینده ویژه موجود، تأمین اکسیژن، رطوبت، درجه حرارت، pH، تأمین مواد غذایی یا تحریک زیستی[1]، تشدید زیستی[2] با گونه‌های دارای ویژگی‌های فروساختی و سوخت و سازی مورد نظر تحت تأثیر قرار می‌گیرد (دلورنز ۲۰۰۶؛ بوردن و رودریگز ۲۰۰۶). فصل ششم تا دهم یک گزارش کلی از آلاینده‌های مختلف خاک را عنوان می‌کند، و روش‌های زیستی برای تجزیه آلاینده‌ها و پالایش سطحی و زیرسطحی محیط خاک را مورد بحث و بررسی قرار می‌دهد. فنّاوری با موفقیت به منظور پالایش خاک‌ها، لجن‌ها و آب زیرزمینی آلوده شده با هیدروکربن‌های نفتی، حشره‌کش‌ها، نگه‌دارنده‌های چوب، ترکیب‌های نیتروآروماتیک، مواد منفجره، حلال‌ها و دیگر مواد آلی به کار گرفته شده است. کارایی تجزیه میکروبی بی‌هوازی از نیتروتولوئن‌ها در خاک‌های آلوده با ضایعات مهمات نیز در مقیاس‌های آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. توسعه فرایندهای زیست‌پالایی میکروبی افزایش یافته برای پالایش فلزهای سنگین و دیگر ترکیب‌های غیرآلی با تأخیر و بعد از استفاده از زیست‌پالایی آلاینده‌های آلی مورد توجه قرار گرفته است (لوید و لاولی، ۲۰۰۱). روش‌های پالایش میکروبی برای آلاینده‌های فلزی به تفصیل در فصل‌های یازدهم و دوازدهم بحث خواهد شد. حلالیت فلزها با کاربرد ریزجانداران کمولیتوتروفیک[3] با موفقیت در فرآیندهای صنعتی استفاده شده و استخراج زیستی[4] نامیده می‌شود که فلزهایی مانند مس، طلا، اورانیوم و غیره را استخراج می‌کند. فصل سیزدهم در ارتباط با جنبه‌های مولکولی و برنامه‌های کاربردی در فنّاوری زیستی و پالایش زیستی با ریزجانداران استخراج‌کننده زیستی است. شناخت رشد میکروبی و فعالیت یون‌های فلزی اکسید کننده ممکن است برای بهبود زیست‌پالایی فلزها در شرایط اسیدی مفید واقع شود. به هر حال، انتخاب گزینه پالایش زیستی توسط چندین عامل اقتصادی و محیط زیستی تعیین می‌شود. اگرچه تعداد زیادی از ریزجانداران برای تغییر شکل فلزها از سمی به گونه‌های غیرسمی یا برای تغییر دادن حلالیت یا قابلیت دسترسی آن‌ها شناخته شده‌اند، ولی اصلاح خاک‌های آلوده با مخلوطی از آلاینده‌های آلی و غیرآلی می‌تواند کاملاً چالش برانگیز باشد. در برخی نمونه‌ها، زیست‌پالایی تنها می‌تواند به طور موثری به وسیله استفاده از یک زنجیره اصلاحی شامل مراحل جداگانه‌ای برای تخریب آلی (یا بهبودی) و برای حذف/ جداسازی ترکیب‌های غیرآلی مورد استفاده قرار گیرد.

---

1. Biostimulation
2. Bioaugmentation
3. Chemolithotroph
4. Biomining

فرایند تهویه زیستی، سبب تحریک تجزیه زیستی هوازی ترکیب‌های قابل تجزیه در خاک به وسیله تولید اکسیژن برای ریزجانداران موجود در خاک می‌شود. در مقایسه با استخراج بخار یا هوای خاک، تهویه زیستی از سرعت جریان هوای پایین تنها برای تولید مقدار اکسیژن کافی به منظور حفظ فعالیت میکروبی استفاده می‌کند. مدت زمان پاک‌سازی از چندین ماه تا چندین سال است. تهویه زیستی به ویژه روش همراه با استخراج هوای خاک توجه مهندسین محیط زیست را به خود معطوف کرده است. زمان پالایش با کاربرد تهویه زیستی به شدت به ویژگی‌های خاک و مواد شیمیایی در مکان‌های آلوده وابسته است. روش تهویه زیستی با موفقیت برای پالایش خاک‌های آلوده شده با هیدروکربن‌های نفتی، حلال‌های غیرکلردار، برخی حشره‌کش‌ها، نگه‌دارنده‌های چوب و دیگر مواد آلی استفاده می‌شود. رطوبت پایین خاک، اندازه ذرات ریز خاک، درجه حرارت پایین و سطح سفره آب زیرزمینی بالا ممکن است فرایند تجزیه زیستی را محدود کند.

روش‌های گیاه‌پالایی از گیاهان به منظور استخراج، جذب، بی‌تحرک‌سازی یا تجزیه آلاینده‌ها از خاک و آب استفاده می‌کنند. برخی از گیاهان قادر به حذف آلاینده‌ها از خاک با جذب مستقیم هستند، که در ادامه آلاینده را در بافت خود تغییر شکل داده و سبب انتقال و تجمع آن به شکل غیرسمی در بافت‌های گیاهی می‌شوند (ریلوت و همکاران، ۲۰۰۶؛ ماکک و همکاران ۲۰۰۸). روش‌های گوناگون گیاه‌پالایی شامل تجزیه گیاهی[1]، استخراج گیاهی[2]، تثبیت گیاهی[3]، تبخیر گیاهی[4] و پالایش رایزوسفری است. به نظر می‌رسد که ارتباطات گیاه- میکروب کلیدی برای افزایش حذف آلاینده‌های آلی و غیرآلی باشد. روش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهان تراریخت با توانایی‌های سمیت‌زدایی بهبود یافته تحت شرایط مزرعه مورد استفاده قرار گرفته است (ایپن و همکاران ۲۰۰۷، دکارسر ۲۰۰۷؛ ماکک و همکاران ۲۰۰۸). فرایندهای استخراج گیاهی و پالایش رایزوسفری برای تجاری شدن نوید بخش هستند. بحث در رابطه با مزایای روش‌های گیاه‌پالایی و پالایش رایزوسفری در فصل‌های چهاردهم تا شانزدهم آمده است. فنّاوری‌های گیاه‌پالایی برای مناطق وسیع و خاک‌های نسبتاً آلوده که کاربرد فنّاوری‌های پالایش مرسوم و گران‌قیمت در آن‌ها بازدارنده هستند، مناسب‌ترین فنّاوری‌ها هستند.

گروه‌های متنوعی از ریزجانداران در خاک (باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و ویروس‌ها) حضور دارند. در رایزوسفر تعداد آن‌ها به دلیل حضور مقادیر زیاد کربن قابل دسترس آزاد شده به شکل ترشحات ریشه‌ای از خاک غیررایزوسفری زیادتر هستند. گیاهان به حضور ریزجانداران

---

1. Phytodegradation
2. Phytoextraction
3. Phytostabilization
4. Phytovolatilization

به وسیله اصلاحات رشدی مانند همزیستی یا اثرات متقابل با ریزجانداران آزادزی پاسخ می‌دهند (ماکک و همکاران، ۲۰۰۶). اثرات مثبت از تلقیح ریشه‌ها با ریزجاندارن انتخابی (تأمین کننده‌های مواد تحریک کننده رشد، تثبیت نیتروژن، دریافت فسفر و به ویژه آن‌هایی که ژن‌های تخریب را بیان می‌کنند) مورد انتظار است. تقریباً ۴۰۰ گونه گیاهی به عنوان انباشت‌گرهای فوق‌العاده‌ی فلزهای سنگین، که اغلب آن‌ها نیکل را تجمع می‌دهند، طبقه‌بندی شده‌اند. گیاه‌پالایی از گیاهان مرسوم مانند علف‌ها، آفتاب گردان، ذرت، کنف، کتان، یونجه، توتون و تنباکو، بید، خردل هندی، صنوبر و غیره استفاده می‌کند. یافته‌ها توانایی خوبی را برای حذف آلاینده‌ها از مناطق وسیع با غلظت‌های نسبتاً پایین از ترکیب‌های ناخواسته نشان می‌دهند. مهم‌ترین عامل برای انتخاب گیاه مناسب، مقاومت آن گیاه به فلزهای سنگین نبوده بلکه کارآیی در تجمع فلزها سنگین اهمیت دارد.

به طور کلی، آلاینده بایستی در شکل قابل دسترس زیستی باشد و جذب توسط ریشه انجام شود. تغییر موقعیت آلاینده از ریشه به اندام هوایی منجر به آسان‌تر شدن در برداشت گیاهان می‌شود. حجم و یا وزن زیست‌توده برداشت شده می‌تواند با کمپوست کردن، تجزیه بی‌هوازی، سوزاندن با درجه حرارت پایین، یا آب شویی کاهش داده شود که سبب کاهش در هزینه‌های حمل و نقل و مدیریتی می‌شود. پس از تثبیت، توانایی پرکردن متوالی زمین بایستی مورد توجه قرار گیرد.

۱-۴-۲- زیست‌پالایی در خارج از محل

در مواردی که نمونه‌های خاک‌ها نمی‌توانند به شکل درجا و در محل به هر دلیلی (در دسترس نبودن زمین کافی و یا خطر آلودگی هوا و آب‌های زیرزمینی) پالایش شوند، خاک‌ها بایستی حفاری شوند و زیست‌پالایی با استفاده از روش‌های زمین‌پالایی، کمپوست کردن، دپو کردن یا فنّاوری‌های راکتور زیستی با آلاینده آبکی انجام شود. زمین‌پالایی یا دفن کردن در زمین[1] یک فنّاوری زیست‌پالایی ثابت شده در مقیاس کامل است. این فرآیند نیازمند حفاری و قرار دادن لجن‌ها، خاک‌ها و ته‌نشست‌های آلوده به درون بسترهایی است که به صورت دوره‌ای با شخم زدن هوادهی می‌شوند. این بسترها معمولا دارای پوشش و روش‌های دیگری برای کنترل نشت آلاینده‌ها از محل دفن هستند. افزودن مواد مغذی به خاک آلوده و یا تلقیح خاک با ریزجانداران غیربومی به منظور بهبود فرایندهای زیستی و تجزیه زیستی آلاینده‌ها استفاده می‌شود. این روش به طور کلی لایه ۳۰ سانتی‌متری از خاک را پالایش می‌کند و شامل افزودن کودها، عوامل حجم دهنده، شخم دوره‌ای و آبیاری برای تحریک باکتری‌های بومی خاک برای تجزیه آلاینده‌ها است. شرایط محیطی خاک

1. Land treatment

معمولاً، برای رطوبت به وسیله آبیاری، pH نزدیک خنثی به وسیله آهک‌دهی و هوادهی به وسیله شخم فراوان کنترل می‌شود. زمین‌پالایی یک روش پالایشی مقرون به صرفه است که اگر چنانچه خطری از نظر آب شویی آلاینده‌ها به درون سفره آب‌های زیرزمینی یا تبخیر آلاینده ایجاد نکند، هیچ خطری را برای سلامتی پرسنل و جامعه اطراف آن نخواهد داشت. واحدهای زمین‌پالایی با یک سیستم جمع‌آوری شیرابه که از نشت هیدروکربن‌های محلول در آب جلوگیری می‌کند، طراحی شده‌اند. زمین‌پالایی خارج از محل در پالایش هیدروکربن‌های نفتی سبک‌تر موفق‌ترین بوده است.

در روش کمپوست کردن، خاک آلوده با مواد آلی مانند کاه و کلش و خرده‌های چوب و لجن فاضلاب به شکل دپو شده مخلوط می‌شود. افزودن عوامل حجم دهنده آلی هوادهی خاک را بهتر کرده و موادی که به راحتی قابل سوخت وساز باشند، تولید می‌شوند. بدین ترتیب با افزایش درجه حرارت خاک رشد ریزجانداران میانه‌دوست[1] و گرمادوست حمایت می‌شود. پژوهش‌ها در مقیاس آزمایشگاهی و کلی نشان داده‌اند که کمپوست کردن با باکتری‌های گرمادوست و هوازی قادر به کاهش غلظت مواد منفجره (TNT, RDX , HMX)، پیکرات آمونیوم[2] و رساندن سمیت به حد قابل قبول می‌شود. اشکال عمده این روش نیاز به فضای قابل توجه، و افزایش در حجم به دلیل افزودن عوامل حجم دهنده است.

فنّاوری دپوکردن زیستی یک سیستم کمپوست کردن مهندسی است که در آن هوادهی از طریق شبکه‌ای از لوله‌های آب‌پاش انجام می‌گیرد و دارای یک سیستم جمع‌آوری شیرابه برای هیدروکربن‌های محلول در آب است. در مقایسه با واحدهای زمین‌پالایی، این روش به فضای کمتری نیاز دارد. عملیات در آن بیشتر کنترل می‌شوند و برای پالایش هیدروکربن‌های فرارتر مانند بنزین و سوخت‌های جت با پوشش توده و به کاربردن یک فشار منفی سبک به سیستم و کشیدن هوا از طریق خروجی قبل از تخلیه، مناسب است. این روش به شکل موفقی برای پالایش ترکیب‌های آلی فرار[3] (VOC ها) غیرهالوژنی و هیدروکربن‌های سوختی استفاده می‌شود.

سیستم‌های راکتور زیستی می‌تواند بر کمبودهای روش‌های زمین‌پالایی، کمپوست کردن و یا دپو کردن زیستی غلبه کند. با کنترل بیشتر بر pH، درجه حرارت، رطوبت و افزایش فراهمی زیستی به مواد غذایی، منبع انرژی (سوبسترا) و اکسیژن، رشد میکروبی و فعالیت آن‌ها ارتقا یافته و می‌تواند سبب زیست‌پالایی تسهیل شده‌ی آلاینده‌ها در راکتور زیستی شود (وارد و همکاران. ۲۰۰۳). هم‌زدن مداوم نیز سبب پراکندگی خاک و واجذبی آلاینده‌ها از خاک می‌شود و تماس با فاز محلول بهبود می‌یابد که این امر سبب افزایش سرعت تجزیه زیستی می‌شود.

---

1 Mesophilic
2. Ammonium picrate
3. Volatile Organic Compounds

۱-۴-۳- نانوفنّاوری و پالایش مکانی: زمینه‌ای نوظهور

نانوفنّاوری، یعنی ساخت و استفاده از ابزارها، وسایل و سیستم‌هایی که به خاطر اندازه‌ی کوچک و سطح ویژه‌ی بسیار بالا دارای ویژگی‌های جدیدی هستند، به زمینه‌ی نوظهوری از دانش تبدیل شده که دارای کاربرد گسترده در الکترونیک، هوا فضا، ساخت مواد شیمیایی، پزشکی و محیط زیست است (تراتنیک و جانسون، ۲۰۰۶). نانوفنّاوری قابلیت کاربرد در پالایش مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های کلردار، آفت‌کش‌ها و فلزها را دارد. در اوایل دهه ۱۹۹۰، قابلیت احیاکنندگی مواد فلزی مانند آهن با ظرفیت صفر[1] (ZVI)، از منظر توانایی تیمار طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها در سیستم آب‌های آلوده آزمایش شد و به عنوان مانع واکنش‌دهنده‌ی نفوذپذیر در مسیر عبور آب قرار گرفت و در نتیجه آن را پالایش کرد (سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا). آهن با ظرفیت صفر در مقیاس نانو (nZVI) (که دارای ذرات یک تا ۱۰۰ نانومتر با سطح ویژه بسیار بالاست)، با واکنش اکسایش-کاهش به سرعت آلاینده‌ها را تخریب کرد و فرآورده‌ی فرعی سمی هم برجای نگذاشت. با گذشت زمان، ذرات آهن تا اندازه‌ای حل یا ته‌نشین شدند و واکنش‌پذیری آن‌ها کاهش یافت.

فرآورده‌های نانوفنّاوری مانند ذرات دو فلزی (Fe-Ni وFe-Cu)، فوتوکاتالیست‌های نیم رسانا (TiO_2 و ZnO)، نانوذرات پلیمری (آمفی‌فیلیک پلی‌یورتان[2])، آنزیم‌های نانوذره‌ای (پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز) و پلی‌مرهای زیستی قابل تنظیم (پلی‌پپتیدهای شبه الاستین[3]) با قابلیت کاربرد در پالایش برخی از آلاینده‌های فلزی و آلی نیز وجود دارند (واتلینگتون، ۲۰۰۵). ولی از این فرآورده‌ها در مقیاس بزرگ هنوز استفاده نشده است.

نانوفنّاوری یک زمینه نوظهور در پالایش خاک است. در این زمینه به اطلاعات بیشتر درباره‌ی آنالیز چرخه زندگی[4] و کارآمد بودن روش و همین‌طور ارزیابی قرار گرفتن در معرض مواد نانو و سمیت آن‌ها، مورد نیاز است. موسسه ملی علوم[5] ایالات متحده برآورد کرده است که در سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۵ نزدیک به ۱۱۰۰ میلیارد دلار در زمینه نانوفنّاوری و توسعه آن هزینه شود (سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۷).

---

1. Zerovalent Iron
2. Amphiphilic Polyurethane
3. Elastin-like Polypeptides
4. Life Cycle Analysis (LCA)
5. National Science Foundation (NSF)

۱-۴-۴- طراحی پالایش زیستی

از آنجا که هدف پالایش زیستی کاهش غلظت آلاینده آلی تا سطحی است که قابل تعیین نباشد و اگر قابل اندازه‌گیری است، کمتر از حد مجاز باشد؛ معیارهای زیر را بایستی پیش از عملیات اصلاحی در نظر گرفت:

- ریزجانداران باید فعالیت فروساختی لازم و ظرفیت تغییر ترکیب آلاینده با سرعت منطقی را داشته باشند و غلظت آن را تا حد زیر استانداردها برسانند.
- ترکیب هدف بایستی از نظر زیستی در دسترس باشد.
- در طی پالایش، فرآورده‌ی فرعی سمی ایجاد نشود.
- شرایط مکانی بایستی جهت رشد یا فعالیت پایدار میکروبی مناسب باشد.
- فنّاوری اتخاذ شده بایستی از سایر روش‌های جایگزین کم‌هزینه‌تر باشد.

طراحی سیستم پالایش زیستی دقیق باید متناسب با آلاینده‌ی خاص باشد. کاربرد موجودات زیستی آلاینده‌زدای مناسب، نیازمند دانش کافی درباره‌ی علوم زیست محیطی گوناگون و رشته‌های مهندسی است. افزون بر این، برنامه پالایش زیستی بایستی ارزیابی اقتصادی شود و روش پالایشی به کار رفته به عنوان یک راه‌کار جایگزین برای حذف آلاینده از نظر اقتصادی بررسی شود. به محض اینکه برنامه‌ی پالایش زیستی طراحی و اجرا شد، بررسی میزان کاهش سمیت در محل حضور آلاینده و بازیابی فعالیت زیستی و باروری مکان مورد نظر اهمیت می‌یابد (اندرونی و جیانفردا، ۲۰۰۷).

از بین روش‌های تجزیه‌ای، روش مادون قرمز، کروماتوگرافی گازی، طیف‌سنجی جرمی و طیف‌سنجی فلورسنت به عنوان روش‌های قوی و با حساسیت بالا در تعیین آلاینده‌های آروماتیک پذیرفته شده‌اند. برای ارزیابی غلظت باقی‌مانده آلاینده در خاک معمولاً از روش‌های استخراج شیمیایی کامل استفاده می‌شود. غلظت نهایی آلاینده پس از پالایش بایستی کمتر از مقدار تعیین شده توسط استانداردهای محلی باشد.

در زمینه‌ی عوامل کنترل کننده‌ی رشد و سوخت و ساز ریزجانداران در محیط‌های آلوده به اطلاعات بیشتری نیاز است. زیرا برخی از معیارهایی که در بالا به آن‌ها اشاره شد، بیشتر از آنکه تجربی باشند، عملی هستند. تولید پیوسته اطلاعات جدید درباره‌ی مسیرهای تجزیه میکروبی باید فرصت‌هایی را برای آنالیزهای مولکولی زیست محیطی ایجاد کند. آزمون حضور و بیان ژن‌های کلیدی درگیر در پالایش زیستی می‌تواند منجر به اطلاعات بیشتر درباره‌ی فرآیندهای میکروبی شود.

با پیشرفت صنعت پالایش اهمیت درک توزیع آلاینده قبل و بعد از اجرای برنامه پالایش بیش از پیش نمایان شده است. در نتیجه چندین روش جدید به تازگی ارائه شده‌اند که قادر به طراحی و

پالایش سریع‌تر خاک و آب زیرزمینی هستند (سیمون، ۲۰۰۸). استفاده از روش شاخه‌ها و تنه درختان برای توصیف ستون ترکیب‌های آلی فرار، پایش توزیع ماده شیمیایی تزریق شده با رسانایی الکتریکی و روش‌های ژئوفیزیکی مانند رسانایی الکتریکی/هیدرولیکی و اطلاعات پرتونگاری در مقاطع[1] برای بررسی کارایی پالایش زیستی از جمله این روش‌ها هستند. در فصل‌های هفدهم و هجدهم روش‌های مولکولی و محیطی موجود برای پایش فرایندهای پالایش زیستی و رایزوسفری ارائه شده است. همچنین خوانندگان می‌توانند به جلدهای اول و دوم از این مجموعه کتاب‌های بیولوژی خاک از انتشارات اشپرینگر که جزئیاتی درباره‌ی مبانی و کاربردهای پالایش زیستی خاک دارد، مراجعه کنند.

۱-۵- نتیجه‌گیری

بازار جهانی پالایش بازار پویایی است که تغییرات عمده‌ای در ۱۰ سال گذشته داشته است. با تکامل و بزرگ شدن این بازار، مکان‌های آلوده زیادی شناسایی شده‌اند که با روش‌های پیشرفته یا پالایش شده‌اند یا تحت کنترل قرار گرفته‌اند. تقاضا برای روش‌ها و خدمات پاک‌سازی مبتنی بر پالایش زیستی یا پالایش گیاهی به سرعت در حال افزایش است. از آنجا که بیشتر فرآیندهای پالایش زیستی به فعالیت‌های جامعه پیچیده‌ی میکروبی متکی هستند، لازم است که درک بهتری از موارد زیر داشته باشیم:

- ارائه راه‌کار برای بهبود فراهمی زیستی آلاینده‌های آب‌گریز که حلالیت بسیار پایینی در آب داشته و به جذب روی ذرات خاک و ماندن در آن‌جا تمایل دارند.
- شناخت درباره‌ی نقش‌های فعال و وابسته به هم در هر کدام از گونه‌های میکروبی موجود در جامعه میکروبی که برای پالایش زیستی در نظر گرفته شده است.
- یافتن مسیرهای سوخت و ساز هوازی و بی‌هوازی و فرایندهای تنظیم کننده‌ی زیست شیمیایی و ژنتیکی آن‌ها به منظور درک بهتر ماهیت مراحلی که شدت تجزیه و پالایش را محدود می‌کنند.
- شناسایی واکنش‌های آنزیمی کلیدی که در تغییر شکل و دگرگونی آلاینده نقش دارند، با هدف طراحی و مهندسی واسطه‌های زیستی با ویژگی اختصاصی بودن سوبسترا، شدت انجام واکنش و سایر ویژگی‌های فروساختی مطلوب و در نهایت برای مهندسی بهتر مسیرهای فروساختی پالایش زیستی.

---

1. Tomography

- توسعه دانش ما از مسیرهای پالایش زیستی. با وجود ۵۰ سال پژوهش گسترده درباره‌ی پالایش زیستی میکروبی، تنها اطلاعات جزیی درباره‌ی مسیرهای پالایش زیستی ۹۰۰ گونه‌ی شیمیایی موجود است (اوربانس و همکارن، ۲۰۰۳؛ الیس و همکاران، ۲۰۰۶).
- ارائه راه‌کار برای ترکیب روش‌های فیزیکی و شیمیایی با سیستم‌های زیستی به منظور رسیدن به پالایش موثر و کارآمد. زیرا برخی گونه‌های شیمیایی واکنش‌پذیری ذاتی با آنزیم‌ها دارند.
- ادامه‌ی ارائه روش‌های ارزیابی و کنترل بهتر جهت ارزیابی پیشرفت و کارآمدی فرآیندهای پالایش زیستی.

اگرچه از فرآیندهای سریع پالایش زیستی نیز برای لجن و خاک (دوغاب خاک) استفاده شده است (وارد و همکاران، ۲۰۰۳)، اما بیشتر فرآیندهای به کار رفته نسبتاً کند و زمان‌بر بوده و همچنین به دلیل نبودِ شرایط محیطی بهینه برای انتخاب و تحریک رشد سیستم زیستی اتخاذ شده، به نقطه پایانی مطلوبی نمی‌رسید. به هر روی، دلایل غیر موجه دیگری هم در گذشته برای شکست پروژه‌های پالایش وجود داشته است. بخش انرژی ایالات متحده (US DOE) کنسرسیومی برای ارزیابی خطر با شرکت سهامداران[1] (CRESP) تاسیس کرده که دلایل ریشه‌ای این شکست‌ها را بیابند و پیشنهادهایی برای کمک به دپارتمان انرژی ارائه دهند. در گزارشی که به تازگی توسط CRESP ارائه شده است؛ پنج دلیل ریشه‌ای برای شکست پروژه‌ها ذکر شده است: (۱) دانش، مهندسی و فنّاوری پیچیده، (۲) ابهامات اقتصادی، (۳) نقص در مدیریت پروژه، (۴) فرایندهای سیاسی و اعتبار و (۵) تاریخچه و فرهنگ سازمانی (گرینبرگ و همکاران، ۲۰۰۷). برای نمونه، میکروبیولوژیست‌های صنعتی در شروع اعمال فرایند پالایش زیستی از اصول اقتصادی مربوط به روش پالایش، کنترل آن، استانداردهای بهینه‌سازی و تکرارپذیری فرایندهای پالایش زیستی و اصولی مانند آن چیزی که قرن‌ها در صنعت تخمیر رعایت می‌شود، غافل می‌مانند (وارد، ۲۰۰۴). بنابراین نیاز است که طراحی سازمان یافته به گونه‌ای انجام شود که اهداف روشن داشته باشد، راه‌کارهای اجرایی پویا با طرح‌های احتمالی در نظر گرفته شوند و فنّاوری‌های اندازه‌گیری دقیق که نقش مهمی در پروژه پالایش ایفا می‌کنند، اتخاذ شوند (سیمون، ۲۰۰۴).

در ۱۰ سال گذشته فنّاوری‌هایی مانند گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و نانوفنّاوری (موانع واکنش‌دهنده نفوذپذیر مبتنی بر nZVI) به روش‌های جدید عمومی تبدیل شده‌اند. این روش‌ها رقابت با روش‌های قدیمی مانند انجماد/پایداری، استخراج بخار خاک، واجذب حرارتی خاک و پمپاژ و تیمار آب زیرزمینی را شروع کرده‌اند.

1. Consortium for Risk Evaluation with Stakeholder Participation

منابع

AEGIS (2003) A decade of challenge — Canadian environmental industry — competitiveness analysis.

Andreoni V, Gianfreda L (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Appl Microbiol Biotechnol 76:287–308.

Borden RC, Ximena Rodriguez B (2006) Evaluation of slow release substrates for anaerobic bioremediation. Biorem J 10:59–69.

CTCS (2002) Environmental technologies handbook, 5th edn. Canadian Trade Commissioner Service.

de Carcer DA (2007) The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. ISME J 1:215–223.

de Lorenzo V (2006) Blue-print of an oil-eating bacterium. Nat Biotechnol 24:952–953.

Delphi Group (2003). Market intelligence scoping — remediation sub-sector.

Eapen S, Singh S, D'Souza SF (2007) Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnol Adv 25:442–451.

EcoLog Group (2005) HazMat magazine: state of the industry. December/ January Issue.

Ellis LB, Roe D, Wackett LP (2006) The University of Minnesota Biocatalysis/ Biodegradation Database: the first decade. Nucleic Acids Res 34:D517–D521.

Gomez MJ, Pazos F, Guijarro FJ, de Lorenzo V, Valencia A (2007) The environmental fate of organic pollutants through the global microbial metabolism. Mol Syst Biol 3:1–11.

Greenberg M, Powers C, Mayer H, Kossen D (2007) Root causes of unsatisfactory performance of large and complex remediation projects — lessons learned from the United States Department of Energy environmental management programs. Remediation 18:83–93.

Head IM, Martin Jones D, Röling WFM (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. Nat. Rev Microbiol 4:173–182.

Hou BK, Wackett LP, Ellis LB (2003) Microbial pathway prediction: a functional group approach. J Chem INF Comput Sci 43:1051–1057.

Hughes JB, Neale CN, Ward CH (2000) Bioremediation. In: Enclyclopedia of Microbiology, 2nd edn. Academic, New York, pp 587–610.

Hunter-Cevera JC (1998) The value of microbial diversity. Curr Opin Microbiol 1:278–285.

Industry Canada (2008) Environmental Industries. http://www.ic.gc.ca/ epic/ site/ ea-ae.nsf/en/ea02203e.html.

JETRO (2007) Attractive sectors: environment. Japan External Trade Organization, Invest Japan Division, Invest Japan Department, Tokyo, Japan.

Kostelnik KM, Clarke JH (2008) Managing residual contaminants — reuse and isolation case studies. Remediation 18:75–97.

Lloyd JR, Lovley D (2001) Microbial detoxification of metals and radionuclides. Curr Top Biotechnol 12:248–253.

Macek T, Kotrba P, Svatos A, Novakova M, Demnerova K, Mackova M (2008) Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. Trends Biotechnol 26:146–152.

Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) (2006) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol 9A. Springer, Dordrecht.

Masons Water Yearbook (2000–2001) http://www.eicyearbook.co.uk/ rem_ ind. Htm.

Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B (2001) In situ bioremediation potential of an oily sludge degrading bacterial consortium. Curr Microbiol 43:328–335.

Prince RC (1998) Bioremediation. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Supplement to the 4th edn. Wiley, New York, pp 48–89.

Rylott EL, Jackson RG, Edwards J, Womack GL, Seth-Smith HMB, Rathbone DA, Strand SE.

Bruce NC (2006) An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. Nat Biotechnol 24:216–219.

Seshadri R, Heidelberg J (2005) Bacteria to the rescue. Nat Biotechnol 23:1236–1237.

Simon JH (2008) Novel methods of identifying contaminants and monitoring remediation. Remediation 18:1–7.

Simon S (2004) Hazardous site clean-up: a focus on triad. Remediation 15:1–2.

Singh A, Van Hamme JD, Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnol Adv 25:99–121.

Spira Y, Henstock J, Nathanail P, Müller D, Edwards D (2006) A European approach to increase innovative soil and groundwater remediation technology applications. Remediation 16:81–96.

Statistics Canada (2004) Environment industry survey business sector, Minister of Industry, Ottawa.

Tratnyek PG, Johnson RL (2006) Nanotechnologies for environmental cleanup. Nano Today 1:44–48.

Urbance JW, Cole J, Saxman P, Tiedje JM (2003) BSD: the biodegradative strain database. Nucleic Acids Res 31:152–155.

USEPA (2004) Cleaning up the Nation's waste sites: markets and technology trends. Technology innovation and field services division, office of solid waste and emergency response, EPA 542-R-04–015.

USEPA (2007) Proceedings of the nanotechnology site remediation workshop. Region 5 Superfund Division, EPA 905K07001.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 7:503–549.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2006) Petroleum microbiology. Part 1. Underlying biochemistry and physiology. Chim Oggi (Chem Today) 24:52–56.

Ward OP (2004). The industrial sustainability of bioremediation processes. J Ind Microbiol Biotechnol 31:1–4.

Ward OP, Singh A, Van Hamme J (2003) Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. J Ind Microbiol Biotechnol 30:260–270.

Watlington K (2005) Emerging nanotechnologies for site remediation and wastewater treatment.

Prepared for USEPA, Office of Superfund Remediation and Technology Innovation (http://www.clu-in.org).

فصل دوم

سود منطقه‌ای، خسارت جهانی:

نتیجه هزینه‌ی زیست محیطی اقدامات

Pascal Suer, Yvonne Andersson-Sköld,
and Jenny E. Andersson

۲-۱- مقدمه

تمامی هدف پالایش خاک سمیت پایین‌تر و آلودگی کمتر است. ما می‌خواهیم با صرف پول و زمان به این هدف برسیم و اقدام ما در پالایش خاک به نوبه خود سبب آلودگی جدید می‌شود.

درآمد یا سود اقدامات پالایش (مانند خاک پاک‌تر) در سطح محلی است اما هزینه زیست محیطی معمولاً در مقیاس جهانی یا منطقه‌ای است (مانند گرم شدن کره زمین، نشر ذرات یا سایر گازها در هوا، تنوع زیستی و غیره). بنابراین، تعادل هزینه و سود در این مقیاس‌های متفاوت پیچیده است. افزون بر این، هر کسی هزینه‌های زیست محیطی موجود را درک نمی‌کند. اما اگر ما از وجود چنین هزینه‌هایی آگاه باشیم، این امکان وجود دارد که هزینه‌ها را با انتخاب روش‌ها و مواد کم‌هزینه به حداقل برسانیم. برای مثال استفاده از سیمان به جای فولاد برای دیوارهای دودکش یکی از موارد کاهش هزینه‌ها است (بایر و فینکل، ۲۰۰۶).

هدف این فصل نشان دادن روش‌هایی برای بهبود اثر زیست محیطی پالایش خاک است. ما مزایای هر یک از روش‌های پالایش را از این دیدگاه مورد بحث قرار می‌دهیم و به مناطقی که در آن‌ها ممکن است عملکرد زیست محیطی بهبود یابد اشاره می‌کنیم. دو مدل ارزیابی ساده در یک ایستگاه پمپ بنزین به عنوان مثالی از برآورد هزینه زیست محیطی به کار برده می‌شوند. در نهایت ما جنبه‌هایی را مورد توجه قرار می‌دهیم که به خوانندگان برای بهبود فعالیت‌هایشان به منظور پالایش خاک کمک خواهد کرد. هزینه زیست محیطی معمولاً با استفاده از روش‌های مختلف ارزیابی چرخه زیستی[1] (LCA) محاسبه می‌شود. بسیاری از نتایج ما بر اساس LCA و استدلال مربوط به LCA است. روش LCA و مشکلات در مقابل یکدیگر قرار می‌گیرند. استفاده از روش LCA در خاک آلوده توسط سوئر و همکاران (۲۰۰۴) با جزئیات مورد بحث قرار گرفته و در اینجا به آن اشاره نخواهد شد.

۲-۲- گزینه‌های پالایش بهتر و بدتر

متاسفانه هیچ فهرستی از هزینه‌ی زیست محیطی اقدامات (پالایشی) وجود ندارد. هزینه‌ها به بسیاری از عوامل ویژه مکانی وابسته هستند. پالایش‌ها می‌توانند برای یک مکان خاص رتبه‌بندی شوند و این کار برای چند مکان انجام شده است (جدول ۲-۱). هر مطالعه یک روش ثابت را برای مقایسه پالایش‌ها در مکان انتخابی به کار برده است، در حالی‌که خود روش‌ها در مکان‌های مختلف متفاوت هستند. البته مهندسین شرکت اسکن ریل[2] (۲۰۰۰a)، به طور استثنایی از یک روش برای

1. Life cycle assessment
2. ScanRail Consult

مقایسه فنّاوری‌های مختلف در مکان‌های متفاوت استفاده می‌کنند. از این پژوهش‌های مکانی ویژه می‌توان به نتایج کلی در رابطه با اقدامات پالایشی بهتر و بدتر دست پیدا کرد. در جدول ۲-۱ شرح مختصری از اثر روش‌های پالایشی جایگزین در ارزیابی‌ها ارائه شده است. برخی از روش‌های پالایشی مانند گیاه‌پالایی و پایش کاهش طبیعی غلظت در پژوهش‌های مرور شده نیامده‌اند. این موارد نیازمند صرف زمان طولانی هستند که ارزیابی زیست محیطی را پیچیده می‌کند. بسیاری از پژوهش‌های ارائه شده در جدول ۲-۱، در مکان‌هایی انجام شده‌اند که توسعه و پیشرفت محلی در آنجا حتمی بوده و همچنین اقدامات پالایشی بلند مدت نیاز نبوده است.

۲-۲-۱- هیچ کاری نکردن[1]

از دیدگاه زیست محیطی جامع، هیچ کاری نکردن الزاماً بهترین کار نیست. اگر آلودگی در خاک باقی بماند، بر سلامتی بشر در آن منطقه و زیست‌کره اثر دارد. سه مورد مختلف از انجام ندادن فعالیت پالایشی در جدول ۲-۱ آورده شده است (یک مورد توسط دیاموند و همکاران (۱۹۹۹) و دو مورد توسط ویگنس (۱۹۹۹) تشریح شده است). بر اساس ارزیابی زیست محیطی که دیدگاهی گسترده‌تر از ارزیابی خطر منطقه‌ای را شامل می‌شود، در تمامی این موارد روش‌های جایگزین در مقایسه با انجام ندادن هیچ اقدام پالایشی وجود داشته و ترجیح داده شده است. به عبارت دیگر هزینه زیست محیطی حاصل از بهترین پالایش مهم‌تر از هزینه باقی ماندن آلودگی در خاک بود. به هرحال، در همه این پژوهش‌ها انجام ندادن هیچ اقدامی بدترین روش بوده و هنگامی‌که اثر زیست محیطی به طور کامل در نظر گرفته شود، پالایش خاک آلوده می‌تواند سبب بهبود زیست محیطی شود، یعنی در این صورت هیچ کاری نکردن اوضاع را بدتر می‌کند.

1. Doing Nothing

جدول ۲-۱ مقایسه تکنیک‌های پالایش به وسیله روش‌های مختلف LCA

تکنیک‌های مورد استفاده	پایین‌ترین هزینه زیست محیطی	عوامل مهم	منبع
۱. جداسازی ۲. حفاری و دفن ۳. شستشوی خاک ۴. استخراج بخار ۵. زیست‌پالایی در محل ۶. بدون اقدام	-	استفاده از زمین کیفیت خاک تخلیه مواد شیمیایی	(دیاموند و همکاران. ۱۹۹۹)
۱. حفاری و دفن در محل ۲. پوشش سطح با آسفالت ۳. استخراج، تغییر بستر، عملیات حرارتی و دفن	۱	مصرف انرژی کیفیت خاک	(ولک‌وین و همکاران. ۱۹۹۹)
۱. پوشش و جداسازی ۲. پالایش حرارتی خارج از محل ۳. تجزیه بی‌هوازی در محل ۴. تجزیه هوازی در محل ۵. بدون اقدام	۱ ، ۳	مصرف انرژی نشت مواد شیمیایی	(ویگنس ۱۹۹۹)
۱.پالایش حرارتی خارج از محل ۲. ماده دوغابی زیستی[1] خارج از محل ۳. شستشوی خاک خارج از محل ۴. الکترودیالیز در محل	-	مصرف انرژی حمل و نقل خاک	(ریبن‌هد و همکاران. ۲۰۰۲)
۱. تجزیه خارج از محل ۲. پخش زیستی[2] در محل ۳. تهویه زیستی در محل ۴. دیوار واکنش‌پذیر ۵. دیوار فعال زیستی	۲، ۳، ۵	تولید آهن و بتن حمل و نقل خاک استفاده سطحی برای پر کردن مجدد	(مهندسین شرکت اسکن ریل a,b ۲۰۰۰)

1. Bioslurry
2. Biosparging

ادامه جدول ۲-۱ مقایسه تکنیک‌های پالایش به وسیله روش‌های مختلف LCA

تکنیک‌های مورد استفاده	پایین‌ترین هزینه زیست محیطی	عوامل مهم	منبع
۱. پمپاژ و تخلیه هوا ۲. افزودن کربن فعال و زیست‌پالایی در محل با نیترات ۳. با پراکسید هیدروژن به جای نیترات	۲	مصرف انرژی تولید پذیرنده الکترون	(بِندر و همکاران. ۱۹۹۸)
۱. پمپاژ و تخلیه بخار ۲. پمپاژ و تصفیه کربن فعال ۳. بدون اقدام	۲	مصرف انرژی	(وینگس ۱۹۹۹)
۱. دودکش و دریچه (دیوار فولادی) ۲.دودکش و دریچه (بنتونیت/ دیوار سیمانی) ۳. پمپاژ و پالایش	۲، ۳	مقدار فولاد کربن فعال انرژی پمپاژ	(بایر و فینکل ۲۰۰۶)
۱. پمپاژ و پالایش ۲. مکش زیستی[1]، تهویه زیستی و پخشیدگی زیستی ۳. پخش زیستی، تهویه زیستی و اکسایش شیمیایی ۴. دپوکردن زیستی خارج از محل	۲	پوشش منطقه پالایش	(کادوت و همکاران. ۲۰۰۷)
۱. پمپاژ و جذب سطحی ۲. زیست‌پالایی در محل	به بخش ۲-۱-۳ رجوع کنید	مصرف انرژی استفاده از آب-زیزمینی	(آندرسون ۲۰۰۳)
۱. دپوکردن زیستی در محل ۲. دپو کردن زیستی خارج از محل	۲	بستن و آماده-سازی محل (مکان دفن کردن) سمی شدن خاک	(توفِلتو و همکاران. ۲۰۰۵)

1. Bioslurping

۲-۲-۲- زیست‌پالایی در محل می‌تواند خوب یا بد باشد

زیست‌پالایی در محل می‌تواند بهترین و یا بدترین روش برای محیط زیست باشد. در این روش نیاز به حفاری، حمل و نقل و دفن در محل وجود ندارد و در نتیجه نیاز به هزینه برای این فعالیت‌های مقدماتی پالایش نیست (بخش‌های ۲-۲-۴ و ۲-۲-۵ را ببینید). اما در سوی دیگر، برای اقدامات ثانویه مانند تهیه مصالح دیوارکشی، پذیرنده‌های الکترون یا دیگر افزودنی‌ها نیاز به هزینه است. این اقدامات ثانویه می‌تواند به مقدار چشم‌گیری به هزینه‌های زیست محیطی بیافزاید. ازآنجایی که هزینه این اقدامات به سختی در چارچوب LCA کمیت‌سنجی می‌شوند، بنابراین به طور معمول برای LCA در نظر گرفته نمی‌شوند، اما در بیشتر پژوهش‌های پالایش خاک مورد توجه قرار می‌گیرد.

جنبه مهم دیگر در زیست‌پالایی نیاز به پمپاژ افزودنی‌ها یا هوا به سمت پایین، یا پمپاژ آب زیرزمینی به سمت بالا است. پمپاژ و پیامدهای آن نیازمند صرف انرژی هستند (به بخش ۲-۴-۱-۱ رجوع کنید). اگر زمان پالایش طولانی باشد، که معمولاً در زیست‌پالایی نیز همین‌طور است، مصرف انرژی می‌تواند تاثیر چشم‌گیری بر هزینه‌ها داشته باشد. اثر مصرف انرژی در بخش ۲-۳ نشان داده شده است، جایی‌که انرژی استفاده شده برای زیست‌پالایی یا پمپاژ و تیمار پالایش یک عامل تعیین کننده برای انتخاب بهترین گزینه پالایش است. اثر تولید مواد شیمیایی به وسیله بِندر و همکاران (۱۹۹۸) نشان داده شده است. این پژوهش به مقایسه استخراج طولانی مدت آب زیرزمینی با ترکیبی از استخراج آب زیرزمینی و زیست‌پالایی در محل، پرداخت. زیست‌پالایی با افزودن مواد غذایی و یک پذیرنده الکترون به آب قبل از پمپاژ دوباره آن به درون خاک انجام شد. هنگامی‌که پذیرنده الکترون نیترات بود، زیست‌پالایی کمترین اثر را روی محیط زیست داشت، اما اثر آن هنگامی‌که از پراکسید هیدروژن به عنوان پذیرنده الکترون استفاده شد، زیادترین بود. استفاده از پراکسید هیدروژن سبب بالاترین نیاز انرژی و بالاترین تولید ضایعات شد و از دیگر زوایا هم زیان‌آور بود. استخراج طولانی مدت آب زیرزمینی، بدون افزایش زیست‌پالایی، تاثیر متوسطی بر محیط زیست داشت. در این مورد، انرژی پمپاژ کمتر مورد توجه قرار گرفت.

۲-۲-۳- دیگر روش‌های در محل: ساخت مواد

تاثیر ثانویه همچنین می‌تواند در دیگر روش‌های در محل مانند سیستم‌های دودکش و دریچه، دیوارهای واکنش‌پذیر تراوا، یا جداسازی و عایق کردن از طریق پوشش با مواد دارای نفوذپذیری کم هم برجسته باشد (بخش ۲-۴ -۱ را ببینید). ساخت دیوار و مواد پوششی از موارد مهم افزایش هزینه زیست محیطی هستند. در این راستا بایستی توجه ویژه‌ای به استفاده از آهن و فولاد نیز بشود. تولید فولاد نیز تاثیر ثانویه‌ی قابل توجهی بر استفاده از انرژی می‌گذارد.

مقایسه دو دیوار واکنشی نفوذپذیر برای پالایش هیدروکربن‌های کلردار در یک مکان توسط مهندسین شرکت اسکن ریل (a۲۰۰۰) انجام شده است. دیوار اول یک دیوار پیوسته از براده‌های آهن بود (تجزیه شیمیایی) و دیوار دوم مجموعه‌ای از دیوارهایی بود که هوای مخلوط شده با گاز متان در آن تزریق شده بود تا تجزیه زیستی را افزایش دهد. به دلیل هزینه زیست محیطی تولید فولاد، دیوار دوم از نظر زیست محیطی سودمندتر بود. البته دیوار اول از آهن ضایعاتی ساخته شده بود وگرنه هزینه زیست محیطی بیشتر از این هم می‌شد (مهندسین شرکت اسکن ریل a ۲۰۰۰).

مثال دیگر استفاده از فولاد یا سیمان/ بنتونیت برای سیستم قیف و دریچه است. در این رابطه، یک مجرای قیفی از جنس فولاد در یک کارخانه سابق گاز ایجاد شد، تا آب‌های زیرزمینی آلوده را به دریچه‌ای برای پالایش هدایت کند. ارزیابی زیست محیطی نشان داد که مهم‌ترین اثر زیست محیطی به دلیل تولید فولاد بود. هنگامی‌که دیواره‌های فولاد (به طور فرضی) با مخلوط‌های سیمان/ بنتونیت جایگزین شدند، اثر زیست محیطی به سطح قابل مقایسه با پمپاژ و پالایش کاهش پیدا کرد (بایر و فینکل، ۲۰۰۶).

۲-۲-۴- حفاری یا غیرمتحرک کردن: سطوح و حمل و نقل

از دیدگاه زیست محیطی پالایش خارج از محل معمولا روش متوسطی به شمار می‌رود. اثرات پالایش خارج از محل حتی بیشتر از فنّاوری‌های در محل به مکان وابسته هستند. به ویژه اینکه در این راستا، فاصله‌ی جابه جایی و انتقال خاک برای پالایش یا دفن شدن در جایی دیگر نقش اساسی دارد. به طور کلی برای فاصله حمل و نقل بیش از ۲۰۰-۱۰۰ کیلومتر باید به سایر روش‌ها توجه کرد. در انتخاب این روش (تیمار خارج از محل)، به حداقل رساندن حمل و نقل و انتخاب گزینه حمل و نقل سازگار با محیط زیست یک مزیت محسوب می‌شود. فرایندهای ثانویه (مانند ساخت مواد و غیره) نیز در پالایش خارج از محل و غیرمتحرک کردن دارای اهمیت زیادی هستند. یکی از دلایل اصلی اثر زیست محیطی ایجاد سطح کاری برای پالایش است. به ویژه در پالایش درجا که از سطح تنها یک بار استفاده می‌شود، ایجاد سطح مهم است. ساییدگی و تخریب در سطح یک پروژه دائمی نیز با مصرف انرژی و مواد سبب اثر زیست محیطی می‌شود (کادوتی و همکاران، ۲۰۰۷). همین امر برای سطح با نفوذپذیری کم که برای کاهش آب شویی از خاک و قرار گرفتن کمتر انسان در معرض آلاینده‌های خاک ایجاد شده‌اند، نیز صحیح است.

۲-۲-۵- دفن

در اینجا نیز ایجاد سطح و حمل و نقل از معایب دفن کردن به عنوان یک گزینه پالایشی محسوب می‌شوند. اما جنبه منفی سوم دفن کردن، تاثیر آن روی تنوع زیستی است. این مورد به ندرت

ارزیابی می‌شود، اما هنگامی‌که در ارزیابی گنجانده می‌شود تاثیر قابل توجهی دارد. استفاده از زمین برای دفن خاک آلوده مستلزم آن است که زمین برای اهداف یا کارکردهای دیگر قابل استفاده نباشد. در نبود زمین قابل دسترس تنوع زیستی بیشتر در معرض خطر قرار می‌گیرد. اگر مواد پرکننده برای پالایش از منطقه دیگری آورده شوند، معمولا آن منطقه نیز دچار کاهش تنوع زیستی می‌شود. مناسب بودن نسبی دفن به عنوان یک گزینه، به میزان زیادی به ارزش کاربری از سطح زمین بستگی دارد.

۲-۳- مطالعه موردی: دو مدل ساده برای یک ایستگاه پمپ بنزین

برای توضیح بیشتر مفاهیم مورد بحث در بالا نتایج یک مطالعه موردی آورده شده است. این مطالعه دو هدف داشت: مقایسه دو ابزار ساده برای ارزیابی جامع زیست محیطی و به دست آوردن دیدگاه در هزینه زیست محیطی دو گزینه پالایشی. این کار با مقایسه دو روش پالایشی در دو مدل کامپیوتری با مجموعه داده‌های تقریبا مشابه انجام گرفت (آندرسون، ۲۰۰۳).

روش‌های پالایشی مورد مقایسه پمپاژ و تیمار آلاینده با جذب (پس از این به طور خلاصه جذب سطحی نامیده می‌شود) و زیست‌پالایی بودند. مدل‌های کامپیوتری استفاده شده REC و UvA بودند که مدل‌هایی برای ارزیابی اثرات زیست محیطی ایجاد شده با پالایش مکان‌های آلوده هستند. اساس هر دو مدل مبتنی بر ارزیابی چرخه حیات است.

۲-۳-۱- توضیح مکانی و روش‌های پالایش

اطلاعات مورد استفاده از ایستگاه پمپ بنزین در بلک‌استاد[1] (سوئد) بود که در سال ۱۹۸۰ تعطیل شده بود. یک ساختمان مسکونی و یک تعمیرگاه ماشین در یک ملک ۲۰۰۰ مترمربعی قرار داشتند. خاک اندکی با هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH)، بنزن و آلیفاتیک‌ها آلوده شده بود. با توجه به اینکه آب زیرزمینی برای آبیاری استفاده می‌شود و با آلیفاتیک‌ها، BTEX (بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن) و PAH آلوده شده نیازمند پالایش است.

دو گزینه در مقایسه مدل‌های اثر زیست محیطی مورد آزمایش قرار گرفتند. در یک روش آب زیرزمینی به طرف بالا پمپ شده، فیلتر شده و به یک مخزن در همان نزدیکی ریخته شد (روش جذب سطحی). روش دیگر (روش زیست پالایی) تجزیه زیستی با افزودن باکتری‌ها ، مواد غذایی و پذیرنده‌های الکترون (هوا برای دوره طولانی‌تر، پراکسید هیدروژن برای دوره کوتاه‌تر) به آب و برگشت دوباره آب به زیرزمین بود. روش‌ها برای مدل‌ها ساده شدند و فرض شد که زمان‌های

1. Blackstad

پاک‌سازی و نتایج مشابه باشند. این موارد پیش فرض برای ارزیابی عملکرد زیست محیطی مورد انتظار پیش از انتخاب یک روش پالایشی است.

۲-۳-۲- مدل‌های موردی

مدل‌های کامپیوتری REC و UvA به منظور ارزیابی اثر زیست محیطی مورد استفاده قرار گرفتند (ولک‌وین و همکاران ۱۹۹۹ و درونن و همکاران، ۲۰۰۰). این مدل‌ها برای اروپای غربی بوده و به راحتی قابل استفاده هستند. متاسفانه، هیچ مدل سوئدی مرتبطی در دسترس نبود. مدل‌های پیچیده برای تجزیه و تحلیل عمیق جنبه‌های زیست محیطی در پالایش‌های مختلف ارجحیت دارند، اما برای تصمیم‌گیری‌های روزمره مدل‌های ساده‌تر مناسب‌تر هستند.

مدل REC برای ارزیابی سازگاری زیست محیطی مورد استفاده قرار گرفت. ضرایب کاهش خطر و هزینه (مالی) در اینجا آزمایش نشدند. مدل UvA[1] دارای رویکرد دقیق‌تر LCA نسبت به مدل REC است، اما ارزیابی مالی و خطر را ندارد (ولک‌وین و همکاران ۱۹۹۹).

برآورد واقعی استفاده از تجهیزات و انرژی از کاربرد عملی هر دو روش در محل قابل دسترس بودند. اطلاعات دقیق در جدول ۲-۲ (REC) و جدول ۲-۳ (UvA) نشان داده شده است. این موارد همچنین تعدادی از ایده‌های مورد نیاز برای اجرای مدل‌ها را در اختیار می‌گذارد. داده‌های ورودی نسبتاً ساده هستند چون‌که این مدل‌ها شامل مقادیری متوسط برای بسیاری از فرایندها مانند استفاده از انرژی و انتشار از فرایندهای ثانویه مانند تولید ماشین‌آلات، لوله‌ها و پراکسید هیدروژن هستند.

1. Umweltbilanz von Altlastensanierungsverfahren

جدول ۲-۲ اطلاعات ورودی برای مدل REC

طبقه‌بندی اطلاعات	جذب سطحی	زیست‌پالایی
موقعیت فعلی		
اهداف کیفی ($\mu g\ l^{-1}$)	۱۰۰	۱۰۰
مقدار اثرات متقابل ($\mu g\ l^{-1}$)[a]	۱۰۰	۱۰۰
غلظت آلیفاتیک‌ها ($\mu g\ l^{-1}$)	۲۰۰	۲۰۰
حجم آب زیرزمینی آلوده شده (m^3)	۲۰۰	۲۰۰
طبقه‌بندی پالایش		
بار (m^3a)	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱
آب زیرزمینی مصرف شده (m^3)	۲۰۰	۵۰
حجم آب زیرزمینی برای پمپاژ (m^3)	۲۰۰	۵۰
ارتفاع بالا بردن (m)	۶	۶
حجم آب زیرزمینی برای پالایش (m^3)	۲۰۰	۲۰۰
ضایعات (m^3)	۰/۰۰۱۸	۰
استفاده از زمین (m^2)	۵	۵
زمان مورد نیاز برای پالایش (a)	۰/۵	۰/۵

[a] مقداری که خطر آلودگی مکانی را ارزیابی می‌کند (راهنمای استاندارد سوئدی[1])

1. Swedish guideline value

جدول ۲-۳ اطلاعات ورودی برای مدل UvA

طبقه‌بندی اطلاعات	جذب سطحی	زیست‌پالایی
خطر (قبل پالایش/ بعد پالایش)[a]		
خطر مربوط[b]	۴/ ۵/۳	۴/ ۵/۳
منطقه ناامن	۴/ ۱۰/۳	۴/ ۱۰/۳
مساحت مکان آلوده (m^2)	۰/ ۲۰۰۰	۰/ ۲۰۰۰
حجم آب زیرزمینی آلوده شده (m^3)	۰/ ۲۰۰	۰/ ۲۰۰
کاربری مکان آلوده:	منطقه مسکونی	منطقه مسکونی
نیازها		
روزهای کاری برای ساخت تجهیزات (روز)	۳	۳
زمان مورد نیاز برای پالایش (روز)	۱۸۰	۱۸۰
میانگین چگالی خاک ($t\ m^{-3}$)	۱/۸	۱/۸
فاصله تا تصفیه‌خانه (m)	۱۰۰	۱۰۰
استفاده از زمین (m^2)	۵	۵
حجم خاک برای پالایش (m^3)	۱	۱
حجم آب زیرزمینی برای پالایش (m^3)	۲۰۰	۲۰۰
پمپ هیدرولیکی		
زمان راه‌اندازی (روز)	۱۸۰	۱۸۰
سرعت پمپاژ (m^3/h)	۰/۰۵	۰/۰۱
ارتفاع بالا بردن (m)	۶	۶
برگشت آب به زیرزمین (٪)	۰	۱۰۰
جذب سطحی		
وزن کل مواد خطرناک (kg)	۰/۰۴	-
گنجایش کربن فعال (٪)	۵	-
کربن فعال پس از استفاده	دور ریخته می‌شود	-
زیست‌پالایی		
زمان راه‌اندازی (روز)	-	۱۸۰
نیترات سدیم ($NaNO_3$) (kg)	-	۰/۵
پراکسید هیدروژن (H_2O_2) (kg)	-	۰/۱

[a] تغییرات اثر ناچیزی را بر نتیجه مدل دارند

[b] سطح خطر قابل قبول

۲-۳-۳- نتایج موردی

مدل‌های REC و UvA از منظر سودمندی روش‌های پالایشی با هم متفاوت بودند. مدل REC نشان داد که روش جذب سطحی اثر زیست محیطی بیشتری را نسبت به زیست‌پالایی ایجاد کرد. مقوله‌هایی از روش جذب که هزینه‌های زیست محیطی بیشتری را ایجاد کردند شامل مصرف آب زیرزمینی و انرژی، نشر گازها و تولید ضایعات بود. مقوله‌ای که بیشترین هزینه‌های زیست محیطی را در هر دو روش داشت، استفاده از زمین بود. استفاده از زمین در این مطالعه موردی، منطقه اشغال شده به وسیله تجهیزات برای فرایند پالایش و پمپاژ بود (۵ m^2). دلیل اینکه استفاده از زمین سبب بیشترین هزینه‌های زیست محیطی می‌شود، با اینکه بیش از ۵ m^2 هم نبود، این است که روش‌ها به طور کلی تاثیر کمی داشتند که بخاطر آلودگی مکانی کم این جایگاه بود.

دلیل اصلی هزینه‌های زیست محیطی بیشتر در روش جذب در مدل REC آن بود که آب زیرزمینی بعد از تیمار جذب سطحی به درون یک حفره ریخته می‌شد. در روش زیست‌پالایی آب دوباره به زیرزمین برمی‌گشت و بنابراین هیچ آب زیرزمینی‌ای مصرف نمی‌شد. افزون بر استفاده از آب زیرزمینی، تیمار جذب انرژی بیشتری را نیز مصرف می‌کرد. چراکه در این روش کل حجم آب زیرزمینی آلوده باید به طرف بالا پمپاژ می‌شد، در حالی‌که در روش زیست‌پالایی تنها بخشی از آب زیرزمینی به طرف بالا پمپاژ می‌شود. استفاده از انرژی همچنین سبب افزایش انتشار گازها و ضایعات می‌شود و مواد فیلتر در روش پالایش جذب سطحی نیز باید دور ریخته شوند که آن هم تولید ضایعات می‌کند.

در سوی دیگر مدل UvA نشان داد که زیست‌پالایی نسبت به جذب سطحی به دلیل استفاده از انرژی بیشترکیفیت پایین‌تری داشت. آنالیز دقیق نشان داد که در پالایش زیست‌پالایی، نیترات و پراکسید هیدروژن با استفاده از یک پمپ اضافه می‌شدند و کار مداوم این پمپ‌ها سبب تفاوت در استفاده از انرژی بود. تاثیر پمپ اندازه‌گیری بر دیگر تفاوت‌ها غالب بود، اما از دست دادن آب زیرزمینی به عنوان هزینه مهم در مدل UvA و همچنین مدل REC به وضوح قابل مشاهده بود.

در مدل UvA مواد تصفیه کربن فعال و افزودنی‌های زیست‌پالایی در مقایسه با استفاده از انرژی پمپاژ و آب زیرزمینی ناچیز بود. این برخلاف نتایج بِندر و همکاران (۱۹۹۸) است که گزارش کردند در مقایسه‌ایی یکسان با کاربرد مدل UvA تولید مواد افزودنی غالب بود، اگرچه استفاده از آب زیرزمینی همچنان مهم‌ترین عامل نامناسب در مطالعه آن‌ها بود. استفاده از انرژی در مدل UvA چهار مرتبه کمتر از مدل REC برای فعالیت‌های یکسان تخمین زده شد. تفاوت احتمالا به دلیل مجموع داده‌های مختلف یعنی فعالیت‌ها و عوامل تاثیرگذار زیست محیطی و همچنین مقادیر آن‌ها، که در این مدل‌ها جای می‌گیرند، ایجاد شد.

۲-۳-۴- نتایج مطالعه موردی

روش‌های پالایشی مقایسه شده به طور کلی هزینه زیست محیطی پایینی داشتند. این مورد به دلیل سطح پایین آلودگی در محل و اثر پایین روش‌های پالایشی استفاده شده بود. بیشترین تفاوت معنی‌دار بین روش‌ها به دلیل مصرف انرژی بود، اما مدل‌ها در این مورد که کدام روش با محیط زیست سازگار است توافق نداشتند.

از دست دادن آب زیرزمینی یک عامل قابل توجه در هر دو مدل بود. با توجه به اینکه آب زیرزمینی در آلمان و هلند یک منبع کمیاب است چندان تعجب‌آور نیست. اگرچه، این مشکل در سوئد وجود ندارد. کیفیت آب زیرزمینی بایستی بهتر شود (از طریق پالایش)، اما از دست دادن m^3 ۲۰۰ آب زیرزمینی اثر مهمی بر محیط زیست اعمال می‌کند و جبران نشدنی است.

به طور خلاصه، مدل‌ها در شناسایی اثرات زیست محیطی مهم ناشی از روش‌های پالایشی مفید هستند. مصرف انرژی، استفاده از زمین و از دست دادن آب زیرزمینی اثرات مهمی بودند، در حالی‌که مواد افزودنی و فیلترها نبودند. نتایج دقیق‌تر تحت تاثیر مرزهای سیستم قرار می‌گیرد و به ویژه محاسبات انرژی نیاز است که با موقعیت واقعی به منظور مقایسه‌ی عادلانه‌ی گزینه‌های پالایش تطبیق داده شود.

در واقع، دو روش پالایش (جذب سطحی و زیست‌پالایی) که به طور متوالی استفاده شدند، با روش جذب سطحی شروع شد. غلظت‌های آلاینده با استفاده از جذب سطحی به مقدار کافی کم نشد و پس از آن زیست‌پالایی با نتایج موفقیت‌آمیزی همراه شد. سپس غلظت‌ها در آب زیرزمینی به سطح قابل قبولی کاهش پیدا کرد و فعالیت پالایشی متوقف شد.

سطح پاک‌سازی کمی که از روش جذب سطحی ایجاد شده بود در مقایسه روش‌ها در مدل‌سازی نادیده گرفته شد، زیرا از قبل پیش‌بینی نشده بود. طبیعتاً بایستی از تیمارهای بی‌اثر اجتناب شود زیرا هزینه زیست محیطی آن‌ها جبران نمی‌شود و تنها برای محیط زیست زیان‌آور هستند.

۲-۴- بهبود پالایش‌های ویژه

ما تاکنون در رابطه با روش‌های کلی پالایش بحث کردیم (بخش ۲-۲) و جزئیاتی از مقایسه گزینه‌های پالایشی ارائه دادیم (بخش ۲-۳). اکنون می‌خواهیم مسیرهایی برای بهبود پالایش‌های وابسته به مکان ارائه کنیم.روش‌هایی که پیچیده و وقت‌گیر نباشند. گاهی اوقات یک فهرست کنترلی ساده می‌تواند مانند یک مدل باشد. ما فهرست کنترلی را آماده کردیم که می‌تواند در بررسی یک روش پالایش به عنوان یک نقطه شروع باشد. برای انجام یک ارزیابی زیست محیطی جامع مهم است که به تمام زنجیره رویدادها و مواد توجه شود. پیشرفت بیشتر ممکن است به

سادگی از طریق دانستن اثرات زیست محیطی و آگاهی از این مسئله که فعالیت‌های پالایشی اثر زیست محیطی دارند، حاصل شود. بنابراین ما مهم‌ترین اثرات زیست محیطی را در زیر شرح می‌دهیم.

۲-۴-۱- موارد قابل توجه

۲-۴-۱-۱- انرژی

استفاده از انرژی و منبع آن یکی از اثرات زیست محیطی است که از اهمیت عمده‌ای در ارزیابی چرخه زیستی برخوردار است. منبع انرژی در مطالعه موردی هم مهم بود. در آنجا امکان اتصال پمپ به شبکه برق سوئد (برقی که از انرژی آب، انرژی هسته‌ای، و برخی سوخت‌های فسیلی تولید می‌شود) فراهم بود. سلول خورشیدی هم ممکن است ارزش توجه داشته باشد و مجموع سوخت‌های فسیلی به عنوان منبع انرژی ممکن است به طور چشم‌گیری هزینه زیست محیطی را افزایش دهند.

استفاده از انرژی در بسیاری از فعالیت‌ها و مراحل پالایش خاک رخ می‌دهد. سوخت فسیلی عموما به عنوان منبع انرژی استفاده می‌شود:

- منبع عمده برای حمل و نقل خاک، افراد و تجهیزات به محل و از محل است.
- انرژی مورد نیاز برای کار کردن پمپ‌ها برای پالایش در محل یکی دیگر از فعالیت‌های انرژی‌خواه است.
- انرژی به کار رفته برای تولید فولاد و پراکسید هیدروژن مورد سومی است که اساسا تقاضای انرژی آن بالا بوده و مبتنی بر سوخت‌های فسیلی نیز است.

۲-۴-۱-۲- منابع طبیعی کمیاب

منابع کمیاب مشهود شامل خاک و سطح برای خاک‌برداری، آب‌های زیرزمینی، سوخت‌های فسیلی و فلزها هستند. مواد و افزودنی‌ها که در بخش ۲-۲ مورد بحث قرار گرفت دوباره در این بخش بیان می‌شوند. ساخت مواد، انرژی نیاز دارد و منابع طبیعی را با کمبود مواجه می‌کند. این مورد عامل مهمی است، اما برای ارزیابی واقعا منصفانه ممکن است استفاده از روش‌هایی مانند LCA نیاز باشد. ارزیابی تاثیر ایجاد شده از تولید دشوار است. برای برخی از محصولات ممکن است بررسی‌هایی انجام شده باشد و یا ارزیابی‌های زیست محیطی ممکن است در برخی از محصولات که می‌توانند به عنوان پایه استفاده شوند انجام گرفته باشد. همچنین داشتن دستورالعمل‌های ملی و اروپایی و یا راهنمای خلاصه از اثرات زیست محیطی موجود به عنوان پایه‌ای برای ارزیابی ساده اما جامع زیست محیطی مفید است، اما برای اغلب محصولات متاسفانه چنین اطلاعاتی هنوز در دسترس نیست. با

وجود نبود اطلاعات کمی و حمایت کننده، بحث کیفی ممکن است در رابطه با اثرات بالقوه زیست محیطی در استفاده از مواد مختلف ضروری باشد.

۲-۴-۱-۳- استفاده از زمین

سطح زمین نیز یک منبع کمیاب محسوب می‌شود، اما طبیعت خاص آن سبب شده که در یک مقوله به تنهایی مورد بررسی قرار گیرد. از دست دادن سطح زمین یک مشکل عمده برای حفظ تنوع زیستی ایجاد می‌کند. پالایش خاک سبب از دست رفتن سطح زمین در مکان‌های مختلف می‌شود: در این راستا خود مکان آلوده، سطحی که برای پالایش یا دفن کردن استفاده می‌شود و سطحی که برای تولید مواد خاکی پوشاننده برداشته می‌شود، قابل بررسی هستند.

۲-۴-۱-۴- انتشار گازهای گلخانه‌ای

بسیاری از شکل‌های استفاده از انرژی می‌تواند سبب انتشار گازها به هوا شود، و در نتیجه ممکن است سبب گرم شدن هوا، اسیدی شدن، تولید ذرات، تشکیل اکسید کننده‌های نوری، یوتریفیکاسیون یا ایجاد سمیت برای انسان شود.

گرم شدن زمین توسط دی‌اکسید کربن (CO_2) و دیگر گازهای گلخانه‌ای، اسیدی شدن توسط انتشار اکسیدهای سولفور (SO_X) و اکسیدهای نیتروژن (NO_X)، اکسیدکننده‌های نوری توسط انتشار ترکیب‌های آلی (CO و VOC) و (NO_X)، یوتریفیکاسیون به وسیله انتشار نیترات و فسفات، و ذرات معلق از سوختن ناقص به علاوه گرد و غبار ایجاد می‌شوند. مقدار کلی و نوع انتشار گازها به منبع انتشار و کارایی سوختن بستگی دارد.

به حداقل رساندن فعالیت‌ها و مراحل استفاده از انرژی و کم کردن نیاز به انرژی در هر یک از فعالیت‌ها و مراحل مهم‌ترین گام ضروری برای کاهش دادن بسیاری از اثرها در مقیاس منطقه‌ای و جهانی است که به طور کلی به دلیل انتشار گازهای گلخانه‌ای ایجاد می‌شوند. در بیشتر موارد، این امر از هر دو دیدگاه اقتصادی و زیست محیطی سودمند است.

انتشار گازهای گلخانه‌ای از خاک و آب ممکن است از آلاینده‌ها در مکان آلودگی و از افزودنی‌های استفاده شده در فرایند پالایش ایجاد شود. همچنین انتشار گازهای گلخانه‌ای از خاک آلوده به زمین یا آب می‌تواند از خاک آلوده در محل دفن و یا در مکان پالایش خارج از محل ایجاد شود. گستره آزادسازی انتشار گازها به شرایط ویژه‌ای بستگی دارد. هر چه سیستم بسته‌تر باشد، انتشارهای کنترل نشده کمتری رخ می‌دهد. در سیستم‌های کنترل شده، آلاینده‌ها در مسیرهایی به دام می‌افتند، تخریب و یا جمع آوری می‌شوند که البته هزینه‌هایی مانند استفاده از انرژی هم در این صورت باید در نظر گرفته شود.

انتشار آلاینده‌ها به هوا، خاک و آب همچنین می‌تواند در مراحل مختلف و در فعالیت‌های درگیر در تولید مواد افزودنی یا دیگر محصولات مورد استفاده در پالایش رخ دهد. ارزیابی‌های زیست محیطی ممکن است برای برخی از محصولات مانند مواد کمیاب انجام شده باشد که می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، اما برای محصولات دیگر متاسفانه هنوز اطلاعاتی در دسترس نیست.

۲-۴-۱-۵- در معرض قرار گرفتن انسان

سمیت برای انسان از یک سو ممکن است به صورت مستقیم با جذب مواد سمی از مکان آلوده مانند آب آشامیدنی آلوده رخ دهد. در سوی دیگر انتشار از مکان آلوده، سوختن مواد آلوده یا قرار گرفتن انسان در معرض گرد و غبار ناشی از فعالیت‌های پالایشی هم می‌تواند سبب ایجاد سمیت در انسان شود. مواد منتشر شده از مکان آلوده در طول پالایش می‌تواند گازهای سمی آزاد شده و یا آلاینده‌های خاک باشند که در طول پالایش به گونه‌های با تحرک بیشتر تبدیل شده و آزاد می‌شوند. در فرایند پالایش گرد و غبار افزایش می‌یابد و ممکن است آلاینده‌ها توسط گرد و غبار حمل شوند. اقدام‌های پالایشی همچنین سبب افزایش سر و صدا و مزاحمت می‌شوند، که باید در ارزیابی خطر زیست محیطی روش‌های پالایشی مورد توجه قرار گیرد.

۲-۴-۲- ابزار مورد استفاده

اگرچه اطلاعاتی که ارزیابی مناسب زیست محیطی را تضمین می‌کنند، کم است اما تلاش‌های کم نیز ممکن است سبب کاهش هزینه‌های زیست محیطی بشود. در واقع با مطالعه این فصل شما هم ممکن است عملیات پالایش بعدی خود را تغییر دهید. صرف چند ساعت برای توجه به اثر زیست محیطی می‌تواند نتیجه را بهبود دهد (اما زمان بیشتر بهتر خواهد بود). ابزارهایی برای کمک در این زمینه از مدل‌های ساده گرفته تا ارزیابی کامل چرخه حیات در دسترس هستند.

اگر فرصتی برای ایجاد ارزیابی کمی از گزینه‌های پالایش وجود داشته باشد، بایستی مدلی انتخاب شود که برای موقعیت‌های مکانی مشابه طراحی شده باشد. منبع مصرف انرژی هم مهم است، چراکه روی ارزش سطح زمین و منابع آب زیرزمینی تاثیر دارد. با توجه به اینکه بسیاری از مدل‌های LCA معمول به شدت روی مصرف انرژی تمرکز می‌کنند، باید چک شود که دیگر مدل‌ها هم این عوامل را در برگیرند. دیگر هزینه‌های زیست محیطی ممکن است به شکل غیرمنتظره‌ای در پالایش خاک بالا باشند و نیاز باشد که مورد توجه قرار گیرند (سویر و همکاران ۲۰۰۴). به طور کلی، مدل‌های محلی ترجیح داده می‌شوند، و در تامین اطلاعات مورد نیاز باید به اطلاعات قابل دسترس توجه شود تا از فرضیات بیش از اندازه جلوگیری شود. فهرست منبع شامل چندین گزینه است.

در نبود امکان ارزیابی کمی، ارزیابی کیفی ممکن است مناسب باشد. مدیریت چرخه حیات (LCM) یک روش کیفی سازمان یافته است که در چهار مرحله توسط دیاموند و همکاران (۱۹۹۹) توضیح داده شده است. در اولین مرحله، هدف و مخاطبان برای LCM مشخص شده‌اند و فرایندها برای پالایش کامل توضیح داده شده‌اند (مانند مواد ثانویه، غلظت‌های آلاینده، و فعالیت‌ها برای مسدود کردن محل). در مرحله دوم، فرایندها با اثرات بالقوه مانند استفاده از انرژی و تولید ضایعات مدنظر هستند. در نظر گرفتن سر و صدا و دیگر مزاحمت‌ها نیز شامل این مرحله می‌شود. تمامی این اثرها با نمره پایین، متوسط یا بالا رتبه‌بندی می‌شوند. در مرحله سوم اثرها ارزیابی می‌شوند تا تصمیم‌گیری شود که چه اقدامی با کمترین اثر زیست محیطی انجام گیرد و در مرحله چهارم هم این اقدامات به کار گرفته می‌شوند.

۲-۵-موارد مورد توجه برای شروع کار

مواردی که برای شروع کار بایستی مورد توجه قرار گیرد:

- **انرژی**
  - حمل و نقل
  - پمپاژ
  - تولید مواد افزودنی
  - تولید مواد
- **منابع طبیعی کمیاب**
  - خاک و سطح
  - آب‌های زیزمینی
  - سوخت‌های فسیلی
  - فلزها
- **استفاده از زمین**
  - دفن کردن، ذخیره‌سازی موقت، مساحت کاری
  - چشم‌انداز زمان یا زمان انجام کار مهم است
- **انتشار**
  - به آب (آلاینده‌ها، مواد شیمیایی، مواد افزودنی)
  - به هوا (اساسا به دلیل حمل و نقل و استفاده از انرژی، گرد و غبار)

- **در معرض قرار گرفن انسان**
  - مکان آلوده شده
  - محیط کاری در طول پالایش
  - انتشار ناشی از حمل و نقل
  - سر و صدا و مزاحمت

۲-۶- جمع‌بندی

با توجه به اینکه امروزه بیشتر جنبه‌های زیست محیطی جامع به طور کامل نادیده گرفته می‌شوند، جای زیادی برای بهبود پالایش وجود دارد. حتی یک بررسی ساده از اثرات زیست محیطی می‌تواند مشخص کند که بایستی از چه روش‌هایی اجتناب شود و در کجا پتانسیل بهبود روش‌ها وجود دارد. چنین بررسی‌هایی بایستی تمام مراحل پالایش را در نظر بگیرند. فهرست موجود در بخش ۲-۴-۳ در این زمینه مفید است. پژوهش‌ها روی اثرات زیست محیطی با کاربرد روش‌های کامل و پیچیده‌تر از آن چیزی که در پالایش کنونی انجام می‌شود، ادامه دارد. نتایج ریز این پژوهش‌ها به شناسایی هرچه بیشتر زمینه‌هایی که امکان بهبود دارند یا بایستی در اولویت قرار بگیرند، کمک خواهد کرد. تاکنون استفاده از انرژی، مواد ثانویه (به ویژه سطوح جاذب و پذیرنده‌های الکترون) و کاربری زمین به عنوان عوامل مهم تاثیرگذار در ارزیابی جامع زیست محیطی زمین‌های آلوده شناسایی شده‌اند. اقدام‌های پالایش خاک ممکن است اثر منفی‌تری نسبت به زمانی که هیچ اقدامی رخ ندهد و آلاینده‌ها در خاک باقی بماند، داشته باشد. اما معمولا یک روش سودمند وجود خواهد داشت. تجربه و دانش خوب مبنای شناسایی و بهره‌برداری از این امکانات است. توصیه می‌شود که هنگام انجام اولین ارزیابی زیست محیطی جامع از تجربه افراد در ارزیابی چرخه زیستی استفاده شود یا آن‌ها هم در پروژه حضور داشته باشند تا اطمینان از صحت ارزیابی حاصل شود.

منابع

Andersson J (2003) Methods to evaluate environmental impacts of contaminated sites remediation — a comparison of two life cycle assessments. MSc thesis, Department of Environmental Science, Linköping University, Linköping, Sweden.

Bayer P, Finkel M (2006) Life cycle assessment of active and passive groundwater remediation technologies. J Contam Hydr 83:171–199.

Bender A, Volkwein S, Battermann G, Hurtig H-W, Klöpffer W, Kohler W (1998) Life cycle assessment method for remedial action techniques: methodology and application. Contaminated Soil ‘98 — Sixth International FZK/TNO Conference, Edinburgh, UK.

Cadotte M, Deschenes L, Samson R (2007) Selection of a remediation scenario for a diesel-contaminated site using LCA. Int J LCA 12:239–251.

Diamond ML, Page CA, Campbell M, McKenna S, Lall R (1999) Life-cycle framework for assessment of site remediation options: method and generic survey. Environ Toxicol Chem 18:788–800.

Drunen MAv, Beinat E, Nijboer MH, Haselhoff A, Veld Mit, Schütte AR (2000) De rmk- metodiek voor het beoordelen van bodemsaneringvarianten — een methode gebaseerd op risicoreductie, milieuverdienste en kosten — rmk fas 3. Internetversie 12 April.

Ribbenhed M, Wolf-Watz C, Almemark M, Palm A, Sternbeck J (2002) Livscykelanalys av marksaneringstekniker för förorenad jord och sediment. Stockholm, IVL Svenska Miljöinstitutet AB, p 108.

ScanRail Consult, HOH Water Technology, NIRAS, Revisorsamvirket/ PKF (2000a) Environmental/ economic evaluation and optimising of contaminated sites remediation — evaluation of demonstration projects. Copenhagen, DSB, Banestyrelsen and Miljøstyrelsen, Denmark, p 99.

ScanRail Consult, HOH Water Technology, NIRAS, Revisorsamvirket/ PKF (2000b) Environmental/economic evaluation and optimising of contaminated sites remediation — method to involve environmental assessment. Copenhagen, DSB, Banestyrelsen and Miljøstyrelsen, Denmark, p 99.

Suer P, Nilsson-Påledal S, Norrman J (2004) LCA for site remediation: a literature review. Soil Sediment Contam 13:415–425.

Toffoletto L, Deschenes L, Samson R (2005) LCA of ex-situ bioremediation of diesel-contaminated soil. Int J LCA 10:406–416
Vignes R (1999) Limited life cycle analysis: a tool for the environmental decision-making toolbox. Strategic Environ Manage 1:297–332.
Volkwein S, Hurtig H-W, Klöpffer W (1999) Life cycle assessment of contaminated sites remediation. Int J LCA 4:263–274.

فصل سوم

فراهمی زیستی آلاینده‌ها در خاک

Joseph J. Pignatello

۳-۱- مقدمه

زیست‌پالایی چه به صورت تحریک موجودات بومی و یا چه به صورت افزودن آن‌ها به خاک باشد، کم هزینه‌تر از روش‌های پالایش فیزیکی و شیمیایی بوده و از نظر زیست محیطی هم اثر تخریبی کمتری نسبت به آن‌ها دارد. در برخی موارد هم از کاهش طبیعی غلظت آلاینده برای مدیریت مکان آلوده استفاده می‌شود. در این روش نیز تغییر شکل آلاینده با میکروفلور طبیعی اگر سازوکار اصلی نباشد، یکی از مهم‌ترین‌هاست.

ارزیابی امکان‌پذیری زیست‌پالایی به عنوان یک روش در پاک‌سازی خاک‌ها و رسوبات آلوده (از این به بعد برای هر دو خاک به کار می‌بریم) یا انتخاب کاهش طبیعی غلظت آلاینده نیاز به دانش جامع درباره‌ی بیولوژی و اثرات ماتریکس خاک دارد. منظور از بیولوژی، توانایی جامعه زیستی خاک به جذب و سوخت و ساز آلاینده‌ها است. منظور از اثرات ماتریکس هم برهم‌کنش خاک با جامعه زیستی و آلاینده‌ها در فرایند زیست‌پالایی است. باکتری‌ها در خاک‌ها بیشتر به ذرات خاک می‌چسبند و بنابراین تحت تاثیر چسبیدن به ذرات و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سطح قرار می‌گیرند. آلاینده‌ها هم به روش‌های پیچیده‌ای با خاک برهم‌کنش دارند و معمولاً جذب و مقاومت در برابر انتقال جرم، در زیست فراهمی[1] آن‌ها برای موجودات زنده تعیین کننده است.

موضوع این فصل درباره‌ی فرایندها و شرایط زمین‌شیمیایی موثر بر زیست فراهمی آلاینده‌های آلی برای ریزجانداران در ماتریکس خاک است. مباحثی که در اینجا مطرح می‌شود تا حدی درباره‌ی گیاهان به عنوان حذف کننده‌ی آلاینده‌ها از خاک در فرایند گیاه‌پالایی هم صدق می‌کند. اما دانش اندکی درباره‌ی این موضوع وجود دارد. در مفهوم گسترده‌تر زیست فراهمی در بحث تصمیم‌گیری درباره‌ی اینکه "منظور از پاک بودن چیست" مهم است. یعنی تصمیم‌گیری در این رابطه که چه سطحی از زیست فراهمی آلاینده (و نه خود آن) سلامتی انسان و سایر موجودات را به خطر نمی‌اندازد (لینز و ناکلز، ۱۹۹۷). این فصل بیشتر دیدگاه نویسنده را نمایان می‌کند و یک بررسی تفصیلی از موضوع نیست. بنابراین تنها ترکیب‌ها یا بخش‌هایی از آن‌ها را در نظر می‌گیرد که به اجزای خاک جذب فیزیکی[2] می‌شوند. جذب فیزیکی شامل برهم‌کنشی از نیروهای ضعیف انتشار[3]، برهم‌کنش دوقطبی و پیوند هیدروژنی است. پس ترکیب‌ها یا اجزای آن‌ها را که با پیوند کوالانسی یا داتیو[4] به ذرات خاک جذب شیمیایی[5] می‌شوند را در بر نمی‌گیرد.

---

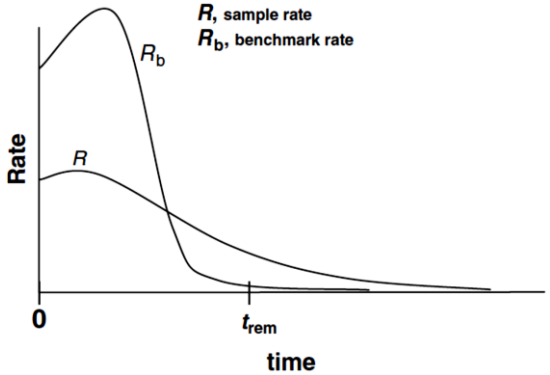
1. Bioavailablity
2. Physisorption
3. Dispersion
4. Coordination
5. Chemisorb

تعریف زیست فراهمی به بستر[1] (زمینه) و موجود مورد نظر بستگی دارد (هارمسِن، ۲۰۰۷؛ NRC، ۲۰۰۳؛ سِمپل و همکاران، ۲۰۰۷). در این فصل در زمینه پالایش خاک، *بخش زیست فراهم* به این صورت تعریف می‌شود: نسبتی از جرم آلاینده که پس از زمان مشخصی از پالایش (t_{rem}) توسط جمعیت فعال در نمونه خاک و در مقایسه با سیستم مرجع، حذف می‌شود. سیستم مرجع محیطی (آب) است که از نظر غلظت شیمیایی آلاینده، حجم آب و جمعیت فعال با نمونه یکسان است. به زبان ریاضی این نسبت از تقسیم مساحت زیر منحنی سرعت حذف آلاینده $[M\ M^{-1}T^{-1}]$ در نمونه بر سیستم مرجع (با زمان) به دست می‌آید (شکل ۳-۱):

$$f_{bioavail} = \frac{\int_0^{t_{rem}} R(t)dt}{\int_0^{t_{rem}} R_b(t)dt} \qquad (۳-۱)$$

از این به بعد در این کتاب منظور از M، جرم؛ T، زمان و L طول است. با انتگرال‌گیری پالایش در زمان بی‌نهایت، مقدار $f_{bioavail}$ در نهایت به *بخش قابل دسترس زیستی*[2] می‌رسد که توسط سِمپل و همکاران (۲۰۰۴، ۲۰۰۷) تعریف شده است. در فرآیند تجزیه آلاینده بین نمونه و سیستم مرجع ممکن است اختلافی در جمعیت تجزیه‌کنندگان ایجاد شود. اما از آنجا که این‌گونه تفاوت‌ها را می‌توان به عنوان بخشی از اثر ماتریکس خاک در نظر گرفت، پس در نمودار تجزیه نرمال‌سازی انجام نمی‌گیرد. اگر پالایش با تحریک زیستی موجودات بومی انجام شود، به دست آوردن مقدار $f_{bioavail}$ دشوار می‌شود. چرا که نمی‌توان این موجودات را به صورت کمّی جدا کرد و در سیستم مرجع قرار داد. با این حال، این تعریف ساده بوده و از نظر مفهومی هم رضایت‌بخش است و کمّی‌تر از سایر تعاریف موجود در منابع است. در ادامه خواهیم دید که رفتار سینتیکی و ترمودینامیکی آلاینده چگونه بر مقدار $f_{bioavail}$ تاثیر می‌گذارد.

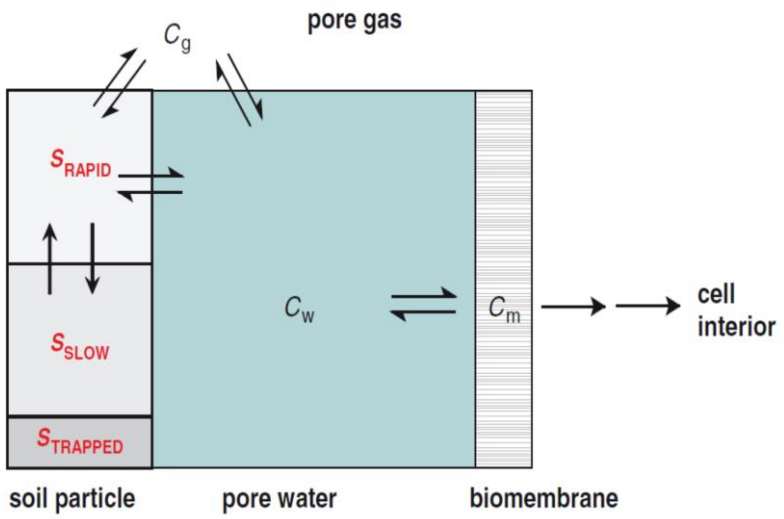
1. Context
2. *Bioaccessible*



شکل ۳-۱ بخش زیست فراهم به صورت نسبت جرم تجزیه شده برای نمونه و سیستم مرجع تعریف می‌شود که معادل نسبت مساحت زیر نمودارهای تجزیه در نمونه و مرجع با زمان پالایش (t_{rem}) است. به دلیل افزایش رشد موجودات شدت تجزیه در زمان‌های میانی افزایش یافته است.

بحث را از دو اصل کلی شروع می‌کنیم که در شکل ۳-۲ آمده است: ۱) تنها مولکول‌هایی که در فاز مایعِ خاک (یعنی آب منفذی و گاز منفذی) هستند می‌توانند با غشاهای زیستی و یاخته‌ها واکنش دهند و ۲) جذب یک فرایندِ کلیدی تنظیم کننده‌ی غلظت در فاز مایع پیرامون غشای زیستی (یاخته) است. اصل اول *زیست فراهمی تسهیل شده*[1] را حمایت می‌کند. به این معنی که موجودات زنده ممکن است بتوانند به اندوخته‌ی آلاینده دسترسی پیدا کنند به طوری‌که در نبود جامعه زیستی این آلاینده از فاز جامد به مایع واجذب نمی‌شود. این مورد در بخش ۳-۳-۷ بحث خواهد شد. اگر فرض کنیم که تعادل بین آب و گاز منفذی وجود دارد و یا غشای زیستی با پوششی از آب در بر گرفته شده است، در این صورت نیازی نیست که اثر مستقیم فاز گازی را در نظر بگیریم. البته هر دو فرض هم در بیشتر خاک‌ها منطقی هستند.

1. *Facilitated bioavailability*



شکل ۳-۲ طرح توزیع آلاینده بین ذرات خاک، آب منفذی، گاز منفذی و غشای زیستی. در بخش ذرات خاک، آلاینده توزیع آزاد در حالت‌های سریع، کند و به دام افتاده دارد. در واقعیت ممکن است توزیع آلاینده محلول از بخش قابل تبادل سریع به بخش کاملاً غیرقابل تبادل پیوسته باشد.

آلاینده بین حالت‌های محلول و جذب شده توزیع خواهد شد (شکل ۳-۲). در بیشتر موارد آلاینده معمولاً جذب شده و غلظت آن در آب منفذی نسبتاً کم خواهد بود. فرض شده که فرایند جذب آلاینده توسط یاخته‌های میکروبی برای بیشتر آلاینده‌ها، جذب غیرفعال باشد. پس آلاینده بین آب منفذی و غشای یاخته توزیع خواهد شد. سرانجام آلاینده در درون یاخته به جایگاه فعال آنزیمی منتقل شده و در آنجا دگرگون خواهد شد. در غلظت‌های نسبتاً کم آب منفذی و با فرض جذب غیرفعال، سرعت ظاهری حذف در واحد وزن خاک R، وابسته به غلظت آلاینده در درون یاخته C_m $[M\ L^{-3}]$ خواهد بود که رابطه‌اش به صورت زیر است:

$$R = k_{int}\varphi C_m B \qquad (۲-۳)$$

که در آن k_{int} $[T^{-1}]$، ثابت سرعت برای محدود کردن فرایند متابولیک درون یاخته‌ای، φ $[L^3M^{-1}]$، مربوط به محتویات غشا یاخته و B $[MM^{-1}]$ تراکم میکروبی خاک است که می‌تواند وابسته به زمان باشد.

از آنجا که غشا دارای ضخامت میکروسکوپی بوده و همیشه در تماس با آب است، منطقی است که تعادل موضعی بین غشا و فاز آبی پیرامون آن فرض شود. در این صورت رابطه ۳-۲ را می‌توان

باتوجه به ضـریب توزیع آب-غشا K_m [L^3L^{-3}]، و غلظت آب منفذی خاک C_w [$M\ L^{-3}$] بازنویسی کرد ($C_m=K_mC_w$).

$$R = k_{int}\varphi(k_m C_w)B \qquad (۳-۳)$$

با افزایش غلظت محلول، تجزیه زیسـتی را می‌توان با سـینتیک اشباع مدل مونود[1] بیان کرد که تجزیه زیستی را با رشد ادغام می‌کند:

$$R = \frac{k_{int}\varphi(k_m C_w)B}{k_m + C_w} \qquad (۴-۳)$$

$$\frac{dB}{dt} = Y_s R + Y_{UOM} r_{UOM} - \lambda B \qquad (۵-۳)$$

که در آن K_m [$M\ L^{-3}$]، ثابت نیم-اشـباع مونود (غلظتی از سـوبسـترا در محلول که در آن سرعت تجزیه نصـف بیشترین سرعت استفاده از سوبسترا باشد)، $\mu_{max} = kint\ \varphi\ (K_M\ K_m)$ و Y_s [$M\ M^{-}$] و Y_{UOM} [$M\ M^{-1}$] [1] به ترتیب فاکتورهای ویژه تبدیل زیستی برای رشد روی سوبسترا و ماده آلی طبیعی قابل اسـتفاده[2] (UOM) هسـتند،r_{UOM} [$M\ M^{-1}T^{-1}$] سرعت استفاده از UOM و λ [T^{-1}] ضـریب زوال (از بین رفتن) مرتبه اول برای درنظر گرفتن شـکار و غیرفعال شـدن یاخته‌های تجزیه کننده اسـت. اطلاعات درباره‌ی رشـد یاخته روی UOM و از بین رفتن آن در خاک اندک اسـت و کمی کردن این اطلاعات دشوار است.

وقتی موجود زنده‌ای وارد خاک می‌شـــود، ابتدا در معرض غلظت آلاینده موجود در فاز آبی قرار می‌گیرد. با شـروع تجزیه، سـرعت تحت تاثیر برهم‌کنش حذف فعال آلاینده توسط یاخته، که سبب کم شـدن غلظت در آب منفذی می‌شـود و واجذب از خاک، که سبب افزایش غلظت آلاینده در آب منفذی می‌شـود، قرار خواهد گرفت. شـرایط حاد (مرزی) شرایطی هستند که:(۱) فاز آبی به صورت پیوسته در تعادل با خاک باشد که دراین صورت همیشه دگرگونی آلاینده دردرون سلول (یا انتقال) محدود کننده سـرعت می‌شـوند و (۲) واجذب از خاک که همیشـه محدودکننده سرعت است. این حالت‌ها به ترتیب کنترل ترمودینامیک و سینتیک زیست فراهمی را منعکس می‌کنند.

در شکل ۳-۲ غلظت ماده جذب شده با توجه به آسانی تبادل با فاز مایع به ترتیب به بخش‌های کُند، سریع و به دام افتاده تقسیم می‌شود. از نظر ریاضی اینکه بخش کُند ابتدا با بخش سریع تبادل

1. Monod model
2. Utilizable natural organic matter

می‌شـــود یا مســـتقیماً با بخش مایع مهم نیســـت. بخش به دام افتاده هم شـــرایطی از نافراهمی را توصـیف می‌کند. یعنی مولکول‌های این بخش در چارچوب زمانی مشـخص شده قادر به ترک ذرات خاک نیســـتند. در واقعیت، ســـینتیک جذب پیوســـتاری از تبادل آنی تا تثبیت در فاز جامد را بیان می‌کند. بنابراین روشـن اسـت که بررسـی سـینتیک و ترمودینامیک زیسـت فراهمی دارای اهمیت است.

۳-۲- زیست فراهمی در شرایط کنترل ترمودینامیک

در سـیسـتم تعادلی آب-خاک، نسـبت توزیع آب-خاک K_d $[L^3\ M^{-1}]$، که وابسـته به زمان است را بررسی می‌کنیم:

$$K_d = \frac{S}{C_w} \qquad (۳-۶)$$

که در آن S $[M\ M^{-1}]$، غلظت جذب شـده در واحد وزن خشک خاک است. حال رابطه سرعت (۳-۳) را می‌توان بازنویسی کرد:

$$R = k_{int}\varphi(k_{m-s}S)B \qquad (۳-۷)$$

که K_{m-s} $[M\ L^{-3}]$، نسبت توزیع در غشا-خاک و معادل K_m/K_d یا C_m/S است.

برای ترکیب‌های غیریونی که بیشتر روی ماده آلی خاک (SOM) جذب می‌شوند، داریم:

$$R = k_{int}\varphi(k_{m-oc}S_{oc})B \qquad (۳-۸)$$

که K_{m-OC} $[M\ L^{-3}]$ و S_{OC} $[M\ M^{-1}]$ شـاخص‌های نسـبت جرمی[1] کربن آلی، f_{OC} هسـتند که نماینده بخش SOM اسـت ($S_{oc}= S/f_{oc}$; $K_{oc}= K_d/f_{oc}$; $K_{m-oc}= K_{m-s}/f_{oc}$). همین‌طور می‌توان $K_{m-s}S$ یا $K_{m-OC}S_{OC}$ را در معادلات مونود (۳-۴ و ۳-۵) جایگزین K_mC_w کرد.

۳-۲-۱- روابط مربوط به فعالیت ساختاری

سـوال مهم این است که ساختار ترکیب چگونه با سرعت حذف آلاینده ارتباط می‌یابد. ظاهراً ارتباط آن از طریق k_{int} اسـت که تابعی از سـازوکارهای زیست‌شیمیایی مرتبط با انتقال ترکیب به یاخته و تغییرشکل آن در درون یاخته است. البته به $K_{m-(s,OC)}$ هم ارتباط دارد. در حقیقت، فراهمی زیستی کنترل شـده‌ی ترمودینامیکی رقابت بین خاک و غشـای زیسـتی برای جزءبندی[2] ترکیب اسـت. با

1. Mass fraction
2. Partitioning

بررسی روابط انرژی آزاد خطی[1] (LFERs) که برای برآورد جزءبندی محیطی و بر مبنای ویژگی‌های مولکولی ترکیب ارائه شده است، می‌توان دیدگاهی درباره‌ی این رقابت به دست آورد. معمول‌ترین LFER استفاده شده برای جزءبندی ترکیب‌های غیریونی، LFER مربوط به اکتانول است. همبستگی خطی بین $\log K_x$ و لگاریتم ضریب جزءبندی ۱-اکتانول-آب، K_{ow} $[L^3\ L^{-3}]$ را ایجاد می‌کند. عمدتاً LFER پیامد اثرات آب‌گریزی را روی جزءبندی منعکس می‌کند که همان رانده شدن از آب به دلیل شکسته شدن ساختار دارای پیوند هیدروژنی آب توسط بخش آب‌گریز مولکول ماده حل شده است. مقادیر K_{ow} برای بیشتر ترکیب‌ها موجود است و برای آن‌هایی که موجود نیست هم می‌توان آن را با استفاده ازگروه‌های عاملی و پارامترهای مرتبط با دقت قابل قبول محاسبه کرد (http://www.syrres.com/esc/kowdemo.htm).

رابطه انرژی آزاد خطی تک پارامتری اکتانول برای ترکیب‌های غیریونی هم خانواده اکتانول مناسب است. اما LFER های چند پارامتری جدید که تعدد نیروها در جزءبندی را در نظر می‌گیرند، برای ترکیب‌های که نزدیکی کمی به اکتانول دارند، دقیق‌ترند (گاس و شوارزنباخ، ۲۰۰۱؛ اِنگوین و همکاران، ۲۰۰۵؛ نیدرِر و همکاران، a,b ۲۰۰۶). در منابع شماری از معادلات خطی انرژی آزاد اکتانول-کربن آلی برای مجموعه‌ای از ترکیب‌های نزدیک به اکتانول وجود دارد (شوارزنباخ، ۲۰۰۲). از آنجا که اندازه‌گیری جزءبندی در غشاهای زیستی واقعی به شکل تجربی دشوار است، بیشتر کارها روی مدل‌های غشایی به ویژه وزیکول‌های فسفولیپیدی دولایه (لیپوزوم‌ها[2]) انجام شده است. این لیپوزوم‌ها مونومرهای فسفاتیدیل کولین[3] مانند دی‌مایریستویل فسفاتیدیل کولین[4] (DMPC)، دی‌اُلیل فسفاتیدیل کولین[5] (DOPC) و دی‌پالمیتویل فسفاتیدیل کولین[6] (DPPC) هستند که به صورت خودساخته ایجاد می‌شوند (اِشر و شوارزنباخ، ۱۹۹۶؛ گوباس و همکاران، ۱۹۸۸؛ کی‌وُن و همکاران، ۲۰۰۶؛ پِیتل و همکاران، ۲۰۰۲؛ ویس و همکاران، ۱۹۹۷). در برخی از موارد دیده شده است که نمودار $\log K_m$-$\log K_{ow}$ برای ترکیب‌های خویشاوند در محدوده‌ی یک تا پنج و نیم برای $\log K_{ow}$ الزاماً خطی است. اما، به نظر می‌رسد LFER، برای ترکیب‌های درشت (فضاگیر)[7] مانند بی‌فنیل‌های چند کلری (PCBs) (دالفر و گاورز، ۱۹۹۵؛ گوباس و همکاران، ۱۹۹۸) و ترکیب‌های استروژنیک[8] (یاماموتو و لیلجسترند، ۲۰۰۴) بایستی تفکیک شود. زیرا این

1. Linear free energy relationships
2. Liposomes
3. Phosphatidylcholine
4. Dimyristoylphosphatidylcholine
5. Dioleylphosphatidylcholine
6. Dipalmitoylphosphatidylcholine
7. Bulky compounds
8. Estrogenic

ترکیب‌ها تمایل به جذب ضـعیف‌تری از مقدار برآورد شـده توسط K_{ow} دارند. دلیل این امر احتمالاً به خاطر از دست رفتن انرژی برای ایجاد حفره جای‌گیری در غشاست که به محض رسیدن مولکول به اندازه‌ی خاص، در غشا ایجاد می‌شود (گوباس و همکاران، ۱۹۸۸؛ کی‌وُن و همکاران، ۲۰۰۶).
با ترکیب LFER اکتانول-کربن آلی با LFER اکتانول-غشا خواهیم داشت:

$$logK_{m-OC} = (a_m - a_{OC})logK_{ow} + (b_m - b_{OC}) \quad (۹-۳)$$

که a_m و b_m به ترتیب شـیب و عرض از مبدا LFER اکتانول-غشـا و a_{OC} و b_{OC} به ترتیب شیب و عرض از مبدا LFER اکتانول- کربن آلی اسـت. شیب و عرض از مبدا (رابطه ۳-۹) برای یک سری از داده‌های موجود که همبســـتگی بین K_{ow} با K_{OC} و همین‌طور K_m در آن‌ها قوی اســـت (یعنی کمتر از ۵/۵~ $\log K_{ow}$)، در جدول ۳-۱ آمده است.

جدول ۳-۱ همبستگی بین K_{m-oc} و K_{ow} (رابطه ۳-۹) برای چند مجموعه داده منتشر شده

سیستم لیپوزوم[a]	سیستم خاک	a_m - a_{oc}	b_m -b_{oc}	K_{m-oc} @ log K_{ow} =1	K_{m-oc} @ log K_{ow} =5.5
۲۰ فنول خنثی در DOPC/DPPC ۸:۲ (log K_m=0.815 log K_{ow} - 0.989; r^2=0.958)(اشر و شوارزنباخ، ۱۹۹۶)	۲۱ ترکیب قطبی در خاک (log K_{oc}= 0.73 log K_{ow} – 0.52);(ان‌گوین و همکاران، ۲۰۰۵)	۰/۰۸۵	-۰/۴۶۹	۰/۴۱	۱/۰
۲۵ ترکیب قطبی و غیر قطبی شامل، ۱۰ بنزن کلری در DMPC (log K_{mw}=1.19 log K_{ow} - 0.645);(گوباس و همکاران، ۱۹۹۸)	۱۱ PAH در خاک (log K_{ocw} =1.14 log K_{ow} - 1.02);(ان‌گوین و همکاران، ۲۰۰۵)	۰/۰۵	۰/۳۷۵	۲/۷	۴/۵
۲۵ ترکیب قطبی و غیر قطبی شامل، ۱۰ بنزن کلری در DMPC (log K_{mw}=1.19 log K_{ow} - 0.645);(گوباس و همکاران، ۱۹۹۸)	۳۳ هیدروکربن هالوژنه در خاک (log K_{ocw} =0.94 log K_{ow} - 0.43);(ان‌گوین و همکاران، ۲۰۰۵)	۰/۲۵	-۰/۲۱۵	۱/۱	۱۴
۱۹ ترکیب قطبی در DMPC (log K_{mw}= 0.904 log K_{ow} +0.515);(وائس و همکاران، ۱۹۹۷)	۲۱ ترکیب قطبی در خاک (log K_{oc}= 0.73 log K_{ow} – 0.52);(ان‌گوین و همکاران، ۲۰۰۵)	۰/۱۷۴	-۰/۰۰۵	۱/۵	۹/۰
۴۷ ترکیب قطبی و غیرقطبی ترکیب شده از مجموعه داده‌های منتشرشده در DMPC (log K_m= 0.761 log K_{ow}+ 0.622, r^2= 0.93);(پاتل و همکاران، ۲۰۰۷)	۱۱۷ ترکیب آب‌گریز غیرقطبی (log K_{oc} =1.03 log K_{ow} – 0.61);(سِت و همکاران، ۱۹۹۹)	-۰/۲۶۹	۱/۲۳	۹/۲	۰/۵۷

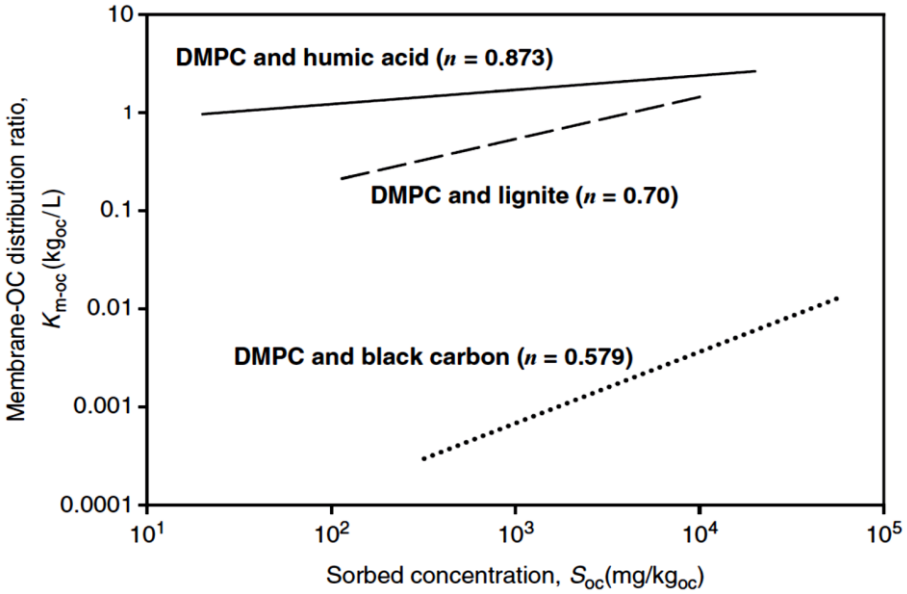
[a] دی‌مایرستول فسفاتیدیل کولین (DMPC)، دی‌اُلیل فسفاتیدیل کولین (DOPC)، دی‌پالمیتویل فسفاتیدیل کولین (DPPC)، هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (PAHs)؛ واحد K_{oc} لیتر در کیلوگرم ($L\ Kg^{-1}$)؛ K_m بدون واحد و فرض می‌شود که چگالی وزیکول ۱/۰۱۴ $g\ cm^{-3}$ است؛ K_{ow} بدون واحد است؛ واحد K_{ow} کیلوگرم در لیتر ($Kg\ L^{-1}$) است.

از این داده‌ها موارد زیر را می‌توان استنباط کرد. (۱) برای به دست آوردن ضریب جزءبندی بدون بعد، پس از ضرب مقادیر $K_{m\text{-}oc}$ در جدول ۳-۱ با فرض چگالی حدود $2\ g\ cm^{-3}$ برای OC، می‌توان دید که ماده حل شده گرایش ترجیحی اندکی نسبت به غشا دارد تا فاز OC. (۲) در ترکیب‌های قطبی و غیرقطبی $K_{m\text{-}oc}$ همانند است. (۳) شیب رابطه ۳-۸ کم است (۰/۲۶۹- تا ۰/۲۵) که نشان می‌دهد جزءبندی غشا-OC معمولاً مستقل از ویژگی آب‌گریزی است. $K_{m\text{-}oc}$ یک برابر به مقدار یکسان یا کمتر از ۴/۵ برابر K_{ow} تغییر می‌کند. این موضوع منطقی نیست. زیرا فراهمی زیستی با افزایش ویژگی آب‌گریزی، کم می‌شود. اگر این رابطه درست باشد، حداقل باید گفت از منظر سینتیکی است نه ترمودینامیکی.

با وجود همبستگی در جدول ۳-۱، ماده آلی خاک (SOM) ماده همگنی نیست که ویژگی‌های جذبی یکنواختی داشته باشد. ماده آلی خاک دارای مولکول‌های درشت با ترکیب شیمیایی و فیزیکی گوناگون و مراحل مختلف تشکیل[1] است. افزون بر این، SOM دارای مواد میکروگرافیتی است که به آن کربن سیاه گفته شده و شامل دوده و زغال است که از تغییر شیمیایی[2] (دراثر حرارت) زیست توده و مواد سوختی ایجاد شده است. در شکل ۳-۳، $K_{m\text{-}oc}$ نفتالن با استفاده از DMPC به عنوان غشای مصنوعی و سه نوع ماده آلی خاک آمده است. از سه نوع ماده آلی با این هدف استفاده شده که طیف گسترده‌ایی از رفتار جذبی پیش‌بینی شده برای ترکیب‌های غیریونی را شامل شود. اسید هیومیک اَمهرست[3] که دارای مولکول‌های درشت هیومیک تازه (نرم) بود، ضعیف‌ترین جذب را نشان داد. لیگنایت[4] (زغال سنگ قهوه‌ای) که دارای مواد هیومیک کهنه (سخت‌تر) بود، تمایل جذبی قوی‌تری برای ترکیب‌های آلی نسبت به مواد هیومیک تازه از خود نشان داد. دوده که نماینده کربن سیاه است، قوی‌ترین جذب را نشان داد چرا که بسیار متخلخل است و قطبیت کمتری از سایر اشکال SOM دارد. شکل ۳-۳ نشان می‌دهد که فراهمی زیستی کنترل شده‌ی ترمودینامیکی (که با $K_{m\text{-}oc}$ بیان می‌شود) ۴ برابر تفاوت داشته و به این ترتیب است: هیومیک اسید> لیگنایت>> کربن سیاه. افزودن جاذب‌های کربنی قوی مانند کربن فعال، سرعت معدنی شدن مواد شیمیایی سخت[5] را کاهش می‌دهد (رودِس و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع، افزودن کربن فعال به رسوبات دهانه رودخانه به عنوان روش پالایشی برای کاهش فراهمی زیستی PCBs برای موجودات کف‌زی پیشنهاد شده است (چو و همکاران، ۲۰۰۷؛ سان و گوش، ۲۰۰۷).

---

1. Diagenesis
2. Pyrolysis
3. Amherst
4. Lignite
5. Spiked chemicals



شکل ۳-۳ نسبت توزیع غشایی دی‌مایریستویل فسفاتیدیل کولین (DMPC) –کربن آلی برای نفتالن در SOMهای متفاوت که به صورت تابعی از غلظت جذب شده رسم شده است. غلظت‌ها در محدوده‌ی غلظت‌های آزمایشی معمول در آزمایش‌های جذب آب-خاک هستند. مقدار K_m از LFER K_{ow} جدول ۳-۱ (گوباس و همکاران، ۱۹۹۸) محاسبه شد. جذب توسط SOM با معادله فروندلیچ برازش داده شد. هیومیک اسید از خاک پیتی آمهرست استخراج شد (لو و پیگناتلو، ۲۰۰۴b). برای لیگنایت از لیگنایت بیولاه-زاپ[1] (OC ٪ ۶۵/۸۵) استفاده شد (ژو و پیگناتلو، ۲۰۰۵b). برای کربن سیاه هم از زغال چوب (OC ٪ ۷۱/۹۷) استفاده شد (ژو و پیگناتلو، ۲۰۰۵a)

۳-۲-۲- وابستگی به غلظت

نسبت‌های توزیع K_m و K_d ضرورتاً با غلظت ثابت نیستند. جزءبندی ترکیب‌های غیریونی (یا گونه‌های طبیعی ترکیب‌های یونیزه شونده) به لیپوزوم معمولاً با غلظت به صورت خطی تغییر می‌کند. البته در غلظت‌هایی که به حلالیت آب نزدیک هستند، چنین نیست (اشر و شوارزنباخ، ۱۹۹۶). این امر عجیب نیست چراکه لیپوزوم یک فاز نسبتاً سیال سه بعدی است. به هر روی، شاید پژوهش‌های آینده نشان دهند که در غشاهای واقعی که دارای پروتئین‌ها و لیپوپروتئین‌های غشایی هستند و فرایندهای جذبی خاصی را ترغیب می‌کنند، جذب غیرخطی مهم‌تر باشد. افزون براین، فرایندهای فعال انتقالی هم که در غشاهای واقعی وجود دارند، احتمالاً حساس به غلظت هستند.

1. Beulah–Zap

جذب در خاک‌ها و SOM اغلب غیرخطی است و با افزایش غلظت برهم‌کنش ضعیف‌تر می‌شود. در بیشتر موارد غیرخطی بودن خیلی برجسته نیست و در برازش هم‌دماها[1] برای سادگی از مدل‌های خطی استفاده می‌شود. بررسی هم‌دماهای دقیق انواع ترکیب‌های قطبی و غیرقطبی در دامنه چند برابری غلظت، در خاک‌های با کربن آلی بالا نشان داد که در هر دو سطح غلظتی بسیار بالا و بسیار پایین، جذب به سمت خطی شدن گرایش دارد (ژیا و پیگناتلو، ۲۰۰۱). جذب بنزن به کربن سیاه دوده کلاً غیرخطی بود اما در غلظت‌های بسیار کم گرایش به جذب خطی داشت (برایدا و همکاران، ۲۰۰۳).

پرکاربردترین مدل غیرخطی استفاده شده برای ترکیب‌های غیرخطی در خاک‌ها مدل فروندلیچ است:

$$S_{OC} = K_{F.OC}\, S_w^n \qquad (۱۰-۳)$$

که K_F پارامتر تمایل جذب و n (معمولاً $0 \leq n \leq 1$) پارامتر مربوط به خطی بودن است. با بیان رابطه بر حسب C_w یا S_{oc}، معادله برای $K_{m\text{-}oc}$ به صورت زیر می‌شود:

$$K_{m-OC} = \frac{K_m}{K_{F.OC}}\, C_w^{1-n} = \frac{K_m}{K_{F.OC}^{1/n}}\, S_{OC}^{(1-n)/n} \qquad (۱۱-۳)$$

برای ترکیب‌هایی که تبادل یونی دارند، مدل لانگ‌مویر را داریم:

$$S_{OC} = \frac{S_{OC}^0 K_L C_w}{1+K_L C_w} \qquad (۱۲-۳)$$

که در این رابطه S^0 $[M\ M^{-1}]$ و K_L $[L^3\ M]$ پارامترهای معادله لانگ‌مویر و به ترتیب برای بیشینه گنجایش جذب و تمایل جذب هستند. نوشتن معادله به شکل زیر معمولاً بهتر است:

$$K_{m-OC} = \frac{K_m(1+K_L C_w)}{S_{OC}^0 K_L} \qquad (۱۳-۳)$$

روابط ۳-۱۱ و ۳-۱۳ پیش‌بینی می‌کنند که فراهمی زیستی ترمودینامیک ($K_{m\text{-}oc}$) با افزایش غلظت اولیه آلاینده در خاک با توجه به درجه غیرخطی بودن هم‌دمای آب-خاک افزایش می‌یابد. از این رو، با پیشرفت حذف آلاینده در فرایند پالایش، فراهمی زیستی کاهش خواهد یافت. شکل ۳-۳ نشان می‌دهد که اگرچه این اثر برای غشایی که در مجاورت فاز جذبی مانند اسید هیومیک که رفتار خطی‌تر دارد (فاکتور تغییر حدود ۲/۷ برابری در $K_{m\text{-}oc}$ در محدوده غلظت آزمایشی ۴ برابری؛ n= ۰/۸۷۳) نسبتاً کوچک است، اما این اثر در مجاورت فازهای جذب غیرخطی‌تر مانند لیگنایت (فاکتور تغییر حدود ۷؛ n= ۰/۷۰) و کربن سیاه (فاکتور تغییر حدود ۴۳؛ n= ۰/۵۷۹) ناچیز است.

دیگر مدل‌های جذب و ترکیب آن‌ها هم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (هاوس و همکاران، ۲۰۰۶a؛ هینز، ۲۰۰۱) اما نتیجه برآورد آن‌ها کاملاً شبیه بوده است: یعنی افزایش فراهمی زیستی با غلظت. باید خاطرنشان کرد که جذب در محدوده غلظت‌های بسیار رقیق، خطی است. مدل

1. Isotherm

فروندلیچ در غلظت‌های بسیار پایین، برآورد واقعی نمی‌دهد، چراکه با نزدیک شدن غلظت به صفر، افزایش در تمایل جذب را برآورد می‌کند.

۳-۲-۳- رقابت با گونه‌های دیگر در محلول

غیرخطی بودن در هم‌دما ($n < ۱$) به معنی توزیع انرژی‌های جذب مکانی است که همان جذب اختصاصی است. وقتی گونه دیگری در محیط باشد می‌تواند با گونه اصلی بر سر مکان‌های جذب رقابت کند و بنابراین K_d و K_{oc} گونه اصلی را کم کند. از این رخداد می‌توان برداشت کرد که جذب غیرخطی از خودرقابتی[1] هم ناشی می‌شود. برای رقابت نیاز است که گونه اصلی و گونه همراه در ابتدا به مکان‌های جذب دسترسی داشته باشند. درجه رقابت به تمایل نسبی هر کدام به مکان جذب وابسته است. از آنجا که در محیط ، بیشتر ترکیبی از آلاینده‌ها دیده می‌شوند تا حضور یک آلاینده، بنابراین اثرهای رقابتی مهم هستند. جذب رقابتی در سیستم خاک و رسوبات دارای چند آلاینده گزارش شده است (مک گینلی وهمکاران، ۱۹۹۳، ۱۹۹۶؛ پیگناتلو، ۱۹۹۱؛ وایت و همکاران، ۱۹۹۹؛ ژینگ و همکاران، ۱۹۹۶؛ ژینگ و پیگناتلو، ۱۹۹۷، ۱۹۹۸) و می‌تواند توسط مدل‌های رقابتی پیش‌بینی شود (ژینگ و همکاران، ۱۹۹۶؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۱، ۲۰۰۲). به نظر می‌رسد رقابت بین ترکیب‌های با اندازه و دارای گروه‌های عاملی همانند، بیشترین باشد (پیگناتلو، ۱۹۹۱؛ ژینگ و همکاران، ۱۹۹۶). همین‌طور اثرهای رقابتی بین آلاینده‌ها و اسیدهای آروماتیک طبیعی در خاک (ژینگ و پیگناتلو، ۱۹۹۸) و بین آلاینده‌ها و مواد هیومیک روی سطوح کربن سیاه (پیگناتلو و همکاران، ۲۰۰۶) هم دیده شده است.

پیش‌بینی می‌شود که جذب رقابتی در لیپوزوم ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد، چراکه هم‌دماهای گونه‌های تکی معمولاً خطی است. رقابت بین ترکیب‌های مختل کننده غدد درون‌ریز و کلسترول گزارش شده است (کیوون و همکاران، ۲۰۰۶). اما این پدیده در صورتی رخ می‌دهد که غلظت کلسترول بسیار بالا باشد (۵۶٪ جزء مولی) و ساختار لیپوزوم هم اندکی دستخوش تغییر شده باشد. این امر می‌تواند بیانگر همان نکته قبلی باشد که غشاهای واقعی به خاطر مولکول‌های پروتئینی یا سیستم انتقالی فعال، در برخی موارد رفتار جذب اختصاصی (وابسته به نوع ترکیب) از خود نشان می‌دهند.

مدلی که به طور موفقیت‌آمیزی در جذب رقابتی به کار گرفته شده تئوری محلول جذب شده‌ی ایده‌آل[2] (IAST) است (رادکی و پراوسنیتز، ۱۹۷۲). این مدل فرض می‌کند که همه گونه‌ها قابلیت دسترسی به مکان‌های جذب را دارند و در غلظت‌های رقیق در فاز جذب شده، یک محلول دو جزئی

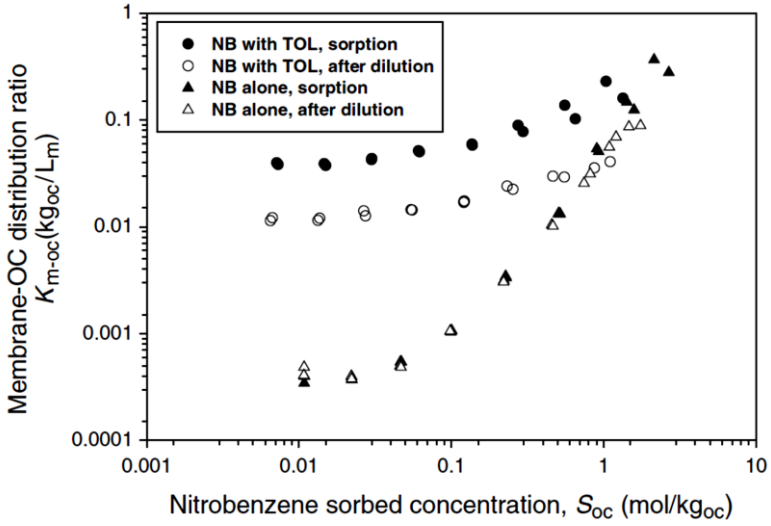
1. Self-competition
2. Ideal Adsorbed Solution Theory

ایده‌آل تشـــکیل می‌دهند. روابط ریاضـــی که غلظت جذب شـــده یک گونه در حضـــور بقیه را بیان می‌کند در منابع آمده است (کریتندن و همکاران، ۱۹۸۵؛ رادکی و پراوسنیتز، ۱۹۷۲). این روابط بر اساس پارامترهای هم‌دمای جذب تک گونه‌ای مستقل به دست آمده‌اند.

کم شدن $K_{d(oc)}$ به دلیل رقابت سبب افزایش $K_{m-s(oc)}$ گونه اصلی خواهد شد و بنابراین فراهمی زیستی آن را با توجه به روابط ۳-۷ و ۳-۸ افزایش خواهد داد. در سوی دیگر، می‌توان انتظار داشت که اگر گونه رقیب از ســیســتم حذف شود (چه حذف زیستی باشد چه غیرزیستی)، فراهمی زیستی گونه اصــلی به دلیل کاهش فشــار رقابت برای مکان‌های جذب، کاهش یابد. همچنین رقابت، خطی بودن هم‌دمای جذب گونه اصــلی را افزایش می‌دهد که ســبب می‌شــود فراهمی زیستی آن کمتر به غلظت حساس شود.

در شــکل ۳-۴ پیامد جذب رقابتی روی زیســت فراهمی کنترل شــده‌ی ترمودینامیکی (K_{m-oc}) نیتروبنزن بــا و بدون تولوئن آمده اســـت. از DMPC به عنوان غشـــاء و از کربن ســـیاه به عنوان منبع OC استفاده شده است. آنالیز هم‌دمای جذب زغال-آب نشان داد که این ترکیب‌ها دامین‌های جـذبی روی هم افتـاده[1] روی دوده یا زغال دارند (سَـــندر و پیگناتلو، ۲۰۰۵a). هم‌دمای جذب تک گونـه‌ای نیتروبنزن پســـمـانـد[2] کمی نشـــان داد، بنـابراین K_{m-oc} جـذب و واجذب آن (به ترتیب ســه‌گوش‌های پر و خالی در شــکل) تقریباً همانند بودند. افزودن غلظت‌های بالای تولوئن (دایره‌های پر)، K_{m-oc} نیتروبنزن را تـا دو برابر افزایش داد کـه دامنـه افزایش بســـتـه به غلظت جذب شـــده نیتروبنزن بود. رقابت همچنین با کم کردن غیرخطی بودن هم‌دمای جذب نیتروبنزن، ســبب کاهش وابســتگی به غلظت K_{m-oc} آن شد. نکته آخر اینکه در شکل ۳-۴ اثر رقابتی معکوس به خاطر رقیق شــدن محلول رویین[3] (دایره‌های توخالی) هم دیده می‌شود. جایی که پس از ۱۰ بار رقیق کردن، به دلیل کم شدن فشار رقابتی تولوئن، کاهش ۳ تا ۶ برابری در K_{m-oc} دیده می‌شود.

1. Fully overlapping sorption domains
2. Hysteresis
3. Supernatant



شکل ۳-۴ اثر رقابتی و اثر رقابتی معکوس روی فراهمی زیستی ترمودینامیکی نیتروبنزن (NB) با استفاده از تولوئن (TOL) به عنوان گونه همراه. جاذب‌ها شامل غشا DMPC (ویس و همکاران، ۱۹۹۷) و زغال (سندر و پیگناتلو، ۲۰۰۵a، ۲۰۰۷) بودند. پس از ده برابر رقیق شدن، جذب (سه‌گوش‌های پر) و واجذب (سه‌گوش‌های خالی) نیتروبنزن تک مرحله‌ای بود. جذب در حضور تولوئن با غلظت اولیه $۴/۲۳\times۱۰^{-۳}$ mol L^{-1} (دایره‌های پر) پس از رقیق شدن ده برابری سبب واجذب تک مرحله‌ای (دایره‌های خالی) شد.

پژوهش‌های اخیر نشان داد که مواد هیومیک (کیوون و پیگناتلو، ۲۰۰۵؛ پیگناتلو و همکاران، ۲۰۰۶) و یون‌های فلزی (چن و همکاران، ۲۰۰۷) بر سر مکان‌های جذبِ کربن سیاه با ترکیب‌های آلی رقابت می‌کنند. برای نمونه در حضور نمک‌های آلومینیوم، انباشت و انعقاد اسید هیومیک روی سطوح زغال رخ می‌دهد و جذب فنانترن روی آن را بسته به غلظت، تا دو برابر کم می‌کند (پیگناتلو و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، می‌توان انتظار داشت که به دلیل این اثرها، گنجایش جذب کربن سیاه در نمونه‌های طبیعی به دلیل اثرهای هوادیدگی، کمتر از مقدار برآورد شده آزمایشگاهی باشد که از آزمایش روی مواد مرجع زغال و دوده به دست آمده‌اند (کرنلیسن و گوستافسون، ۲۰۰۴؛ یانکر و همکاران، ۲۰۰۴).

شواهد مستقیمی از افزایش زیست فراهمی در حضور گونه‌های رقیب گزارش شده است (وایت و همکاران، ۱۹۹۹). معدنی شدن فنانترن توسط *سودوموناس*[1] در دو خاک مختلف، پس از افزایش

1. *Pseudomonas* sp.

پایرن[1] که یک ماده غیرقابل تجزیه زیستی توسط این باکتری است، افزایش یافت. آزمایش موازی با خاک سترون شده نشان داد که افزایش پایرن تا حدی جایگزین فنانترن در محیط شد و K_d آن‌را تا ۸۳ درصد کم کرد (وایت و همکاران، ۱۹۹۹). طبق اطلاع مولفین تاکنون هیچ آزمایشی که عکس این را نشان دهد (یعنی آزمایشی که نشان دهد پس از حذف گونه همراه رقیب فراهمی زیستی کم می‌شود) گزارش نشده است.

گونه‌های همراه در محلول می‌توانند نقش‌های مهمی هم در بیولوژی داشته باشند. آن‌ها ممکن است بر تجزیه گونه اصلی به روش‌های زیر تاثیر بگذارند: الف) سازوکار بازدارندگی آنزیمی به واسطه سوبسترای همراه (برای نمونه رقابت بر سر جایگاه فعال آنزیم)، ب) افزایش سرعت تجزیه از راه اثر ماده سوخت و سازی همراه و ج) از بین رفتن زیست توده با تشکیل فراورده‌های جانبی سمی. در مقاله‌های هاوس و همکاران (۲۰۰۶a،b) روابط مونود نیز با درنظر گرفتن این نقش‌ها بازبینی شد.

۳-۲-۴- اثر پسماند واقعی

در بیشتر مدل‌های انتقال و فراهمی زیستی فرض می‌شود که جذب فیزیکی از منظر ترمودینامیکی دوسویه (برگشت‌پذیر) است. اما، جذب برگشت‌ناپذیر هم رخ می‌دهد و آن هنگامی است که جذب کننده و جذب شونده باهم واکنش داده و کمپلکس نسبتاً پایدار تشکیل می‌دهند. در این موارد منحنی‌های هم‌دمای جذب و واجذب مسیرهای متفاوت جزیی را دنبال می‌کنند که منجر به پسماند واقعی یا ناهمسانی می‌شود. به طوری‌که شاخه واجذب منحنی هم‌دما به سوی شدت‌های بالای جذب متمایل می‌شود. از منظر ترمودینامیک برگشت‌ناپذیری لزوماً به معنای عدم بازیابی[2] نیست.

دو سازوکار برای پسماند واقعی جذب فیزیکی ترکیب‌های آلی در خاک رایج است. یکی پسماند تراکم مویین[3] بخار در مزوپورها[4] است (روکوارول و همکاران، ۱۹۹۹) که در ابتدا بخار به صورت پوشش نیمه‌پایدار در دیواره منافذ متراکم می‌شود و در فشار خاصی این پوشش به صورت بیرون‌زدگی ترمودینامیکی متلاشی می‌شود. فشار بخار در پوشش درون حفره‌ها و بیرون‌زدگی ترمودینامیکی متفاوت است. در نتیجه، هم‌دما در جهت‌های فشارگذاری و فشاربرداری متفاوت می‌شود و شکل مشخصی مانند حلقه بسته[5] ایجاد می‌کند.

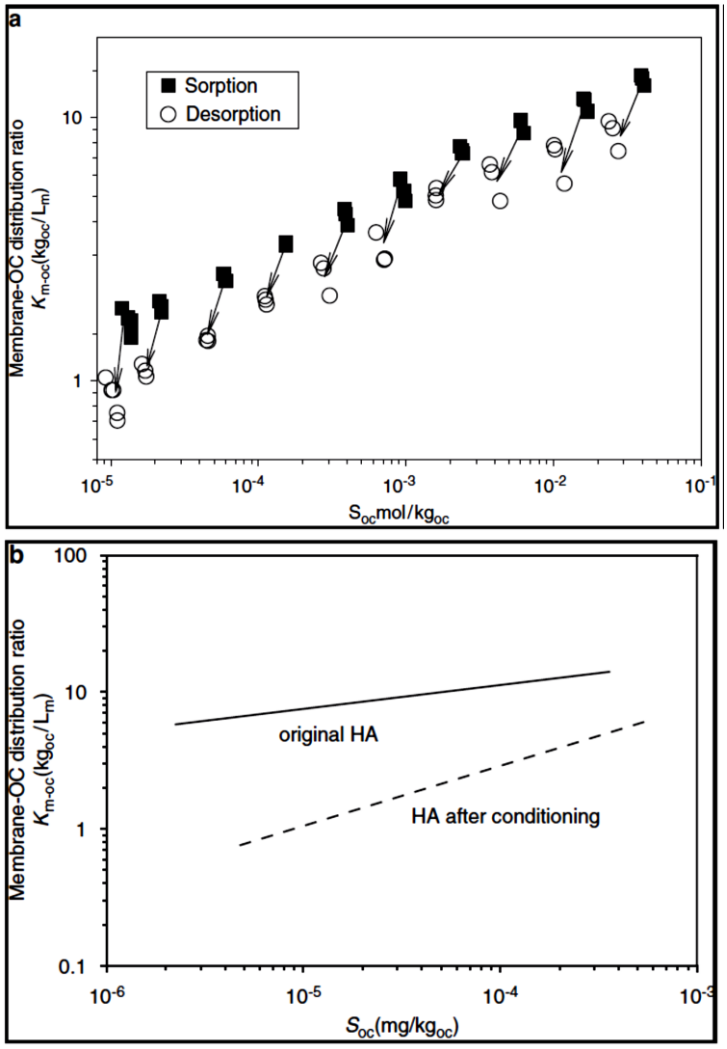
---

1. Pyrene
2. Irretrievability
3. Capillary condensation hysteresis
4. Mesopores
5. Closed-loop

پسماند تغییرشکل منفذی[1] هم نوع دوم است که مشخصه جامدات آلی شیشه‌ای[2] است. ماده آلی خاک هم ویژگی خاص حالت شیشه را نشان می‌دهد (دلاپ و لبوئف، ۲۰۰۴؛ دلاپ و همکاران، ۲۰۰۵؛ لبوئف و وبر، ۲۰۰۰؛ لبوئف و ژانگ، ۲۰۰۵؛ شومن و لبوئف، ۲۰۰۵). پسماند تغییر شکل منفذی وقتی رخ می‌دهد که انبساط برگشت‌ناپذیر(غیر کشسان) ماده جامد توسط عامل نفوذ کننده ورایِ چرخه جذب- واجذب ایجاد شود. انبساط غیرکشسان در ماده جامد حجم اشغال نشده‌ای (به صورت افزایش تعداد یا اندازه منافذ) برجای می‌گذارد که سبب افزایش تمایل جذبِ ماده جاذب برای ماده حل شده در آزمایش بعدی (دوم) می‌شود که این آزمایش دوم هم می‌تواند واجذب باشد و هم جذب دوباره. پسماند تغییر شکل منفذی در SOM گزارش شده است (لو و پیگناتلو، ۲۰۰۲، ۲۰۰۴a؛ سندر و همکاران، ۲۰۰۶؛ سندر و پیگناتلو ۲۰۰۵b). انبساط و تغییرشکل منفذی سبب افزایش جذب (تا سه برابر) در آزمایش‌های جذب-واجذب و همین‌طور آزمایش‌های "اثر آماده‌سازی[3]" دیده شده است که در آن هم‌دمای جذب پیش و پس از تغییر حالت نمونه با همان ترکیب یا ترکیب همسان رسم شده است.

شکل ۳-۵ نشان می‌دهد که چگونه پسماند تغییرشکل می‌تواند سبب کاهش K_{m-oc} شود. در بخش a شکل ۳-۵، K_{m-oc} مربوط به جذب و واجذب تک مرحله‌ای در خاک دارای ۱ و ۴ دی‌کلرو بنزن رسم شده است. فلش‌ها نشان دهنده تفاوت داده‌های جذب و واجذب هستند. در بخش b شکل ۳-۵ جذب ۱ و ۳ دی‌کلرو بنزن روی اسید هیومیک جامد پیش و پس از آماده‌سازی آن با غلظت بالای کلرو بنزن نشان داده شده است.

1. Pore deformation hysteresis
2. Glassy organic solids
3. Conditioning effect



شکل ۳-۵ اثر جذب برگشت‌ناپذیر روی غشا-OC خاک. ضریب توزیع غشا مقدار آزمایشی برای وزیکول DMPC است (گوباس، ۱۹۸۸). a) پسماند جذب-واجذب ۱ و ۴ دی‌کلرو بنزن در پیت پاهوکی[1] (برگرفته از پیگناتلو، ۲۰۰۶). پیکان‌ها اختلاف جذب و واجذب تک مرحله‌ای داده‌ها با سه تکرار را نشان می‌دهند. b) جذب و واجذب ۱ و ۳ دی‌کلرو بنزن در اسید هیومیک آمهرست، پیش و پس از آماده‌سازی آن با کلرو بنزن. پارامترهای جذب از سندر و همکاران (۲۰۰۶) است. خط‌ها حاصل برازش داده‌ها به رابطه ۳-۱۱ هستند.

1. Pahokee peat

۳-۳- فراهمی زیستی در شرایط کنترل سینتیک

در ادامه شـرایطی را بررسی می‌کنیم که تغییرشکل درون یاخته‌ای (یا انتقال) در مقایسه با واجذب از خاک تندتر اسـت. پژوهش‌های زیادی در این زمینه موجود است که نشان می‌دهند واجذب عامل کاهش شدت تجزیه زیستی است (برخی از آن‌ها شامل: بوسما و همکاران، ۱۹۹۷؛ برایدا و همکاران، ۲۰۰۴؛ ریجنارتس و همکاران، ۱۹۹۰؛ وایت و همکاران، ۱۹۹۹).

سـوبسـترای تجزیه شـونده با انتقال جرم (واجذب) از فاز جامد وارد محلول شده و با همرفت یا پخشیدگی به غشای زیستی می‌رسد. ساده‌ترین حالت آن است که ذرات خاک و یاخته‌ها در محیط آبی مانند راکتور زیستی مایع به خوبی پخش (توزیع) شده‌اند و پخشیدگی بین ذرات، شدت تجزیه را کنترل می‌کند. حالت پیچیده‌تر در سـتون خاک ایسـتا دیده می‌شود که در آن آب جریان دارد و موجود زنده‌ای که روی یک ماده شـیمیایی کار می‌کند، از جایی به جای دیگر در سـتون جا به جا می‌شود؛ مانند حالتی که آب توسط ریشه‌ها جذب می‌شود.

انتقال جرمی ماده شـیمیایی جذب فیزیکی شـده درون ذرات خاک، بین ذرات میکروسـکوپی و سطح مشترک فاز آبی، توسط قوانین شدت پخشیدگی کنترل می‌شود. پخشیدگی تمایل مولکول‌ها به جابه جایی در پاسـخ به شـیب غلظت شـیمیایی است و تا جایی پیش می‌رود که بیشترین مقدار بی‌نظمی[1] ایجاد شـود. پخشـیدگی تابعی از ساختار مولکول، ماهیت و شکل هندسی محیطی که در آن پخشـیدگی رخ می‌دهد، شیب غلظت، شرایط مرزی سطح مشترک و دما است. مدل‌های ریاضی پخشـیدگی برای شـکل‌ها و انواع مختلف محیط‌های پخشیدگی و موقعیت‌های گوناگون مورد بحث قرار گرفتـه‌اند (کرَنک، ۱۹۷۵؛ هاوس و همکاران، ۲۰۰۶a؛ کارگر و روتوِن، ۱۹۹۲؛ پیگناتلو، ۲۰۰۰). با توجه به ناهمگنی خاک‌ها نوشتن قوانین همه جانبه سرعت برای سیستم خاک آسان نیست.

رسـیدن به تعادل پخشـیدگی در سـوسـپانسیونی که خوب مخلوط شده باشد، بسته به ترکیب وخاک مورد آزمایش از چند سـاعت تا چند ماه طول می‌کشـد (پیگناتلو و ژینگ، ۱۹۹۶). پس از ایجاد رقیق‌سـازی، زمان تعادل بیشـتر هم می‌شـود. در بیشتر پژوهش‌ها از روش زدودگی فیزیکی[2] برای شـبیه‌سـازی واجذب در محلول‌های بسـیار رقیق استفاده می‌کنند. معمولاً عوامل زداینده[3] در این پژوهش‌ها رزین پلیمری مانند تناکس[4] یا رزین XAD است (پیگناتلو، ۱۹۹۰a؛ ژائو و پیگناتلو، ۲۰۰۴) که به مقدار زیاد به سـوسـپانسـیون خاک افزوده می‌شود تا اطمینان حاصل شود که انتقال جرم ترمودینامیکی قابل توجه رخ دهد و غلظت در فاز مایع به صـفر برسـد. روش دیگر که از اصول

1. Entropy
2. Physical stripping techniques
3. Stripping agent
4. Tenax

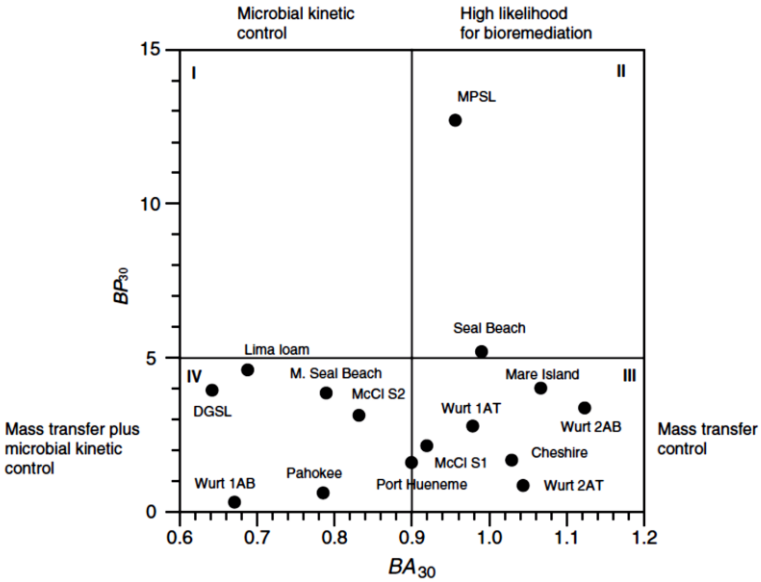
مشـابه اسـتفاده می‌کند اسـتخراج با عوامل جدا کننده مانند سیکلودکسترین‌ها است که دارای یک حفره آب‌گریز هستند (رودس و همکاران، ۲۰۰۸؛ سِمپل و همکاران، ۲۰۰۷). از جریان گاز هم برای اهداف مشـابه در آزمایش‌های واجذب فاز گازی در سـتون خاک استفاده شده است (ورث و هنسن، ۲۰۰۲؛ ورث و رینهـارد، b، ۱۹۹۷a). واجـذب کـامـل آلاینـده‌هـایی کـه جذب قوی دارند با عوامل زداینـده نیـاز بـه زمـان بسـیـار طولانی دارد. اغلب در طول مراحلی از تجزیه که حذف آلاینده از ترکیب‌های دارای جذب متوسـط تا قوی در برخی قسمت‌ها توسط پخشیدگی درون ذره‌ای محدود شـده اسـت، این مورد دیده می‌شـود. شـاخص‌هایی برای توصـیفِ مرحله محدودیت سـرعت تجزیه زیستی یا واجذب پیشنهاد شده‌اند.

این شاخص‌ها معمولاً مبتنی بر قرارداد دامکوهلر[1] هستند که از یک عدد بی‌بُعد برای ربط دادن مقیاس زمانی تجزیه زیسـتی به مقیاس زمانی واجذب اسـتفاده می‌کند. یکی از این شـاخص‌ها «بهترین عدد[2]» اسـت که نسـبت ثابت سـرعت تجزیه زیسـتی مرتبه اول $[T^{-1}]$ به ضـریب سرعت انتقال جرم مرتبه اول $[T^{-1}]$ بوده و در بخش ۳-۳-۳ تعریف شـده است. به هر روی، این شاخص‌ها تغییرات در سرعت‌های متناظر که در طول دوره‌ی تجزیه اتفاق می‌افتند را در بر نمی‌گیرند و ممکن اسـت جذب تعادلی را به خوبی منعکس نکنند (هاوس و همکاران، ۲۰۰۶a). شـبیه‌سازی‌هایی برای نشـان دادن انتقال بین تجزیه زیسـتی و واجذب که با پیشـرفت تجزیه دارای محدودیت سـرعت می‌شود، وجود دارند (هاوس و همکاران، ۲۰۰۶b).

برایدا و همکاران (۲۰۰۴) تجزیه زیسـتی فنانترن (توسـط *سـودوموناس*ها) و واجذب آن در ۱۵ خاک سترون مختلف را به طور جداگانه مطالعه کردند. شاخص‌هایی برای پتانسیل زیست فراهمی و دگرگونی زیسـتی در زمان مشـخص t پیشـنهاد شـد تا پتانسیل تجزیه زیستی موفق را بیان کنند. شـاخص زیست فراهمی[3] BA_t، نسبت جرم دگرگون شده زیستی به جرم واجذب شده از خاک بوده که روی رزین تناکس جذب شـده بود. این شـاخص بیانگر شـدت دگرگونی زیستی نسبت به شدت واجذب اسـت که ممکن اسـت به حداکثر واجذب نزدیک شـود. شاخص پتانسیل دگرگونی زیستی[4] BTP_t، نسـبت بین جرم دگرگون شـده زیسـتی و جرمی است که پس از رخ دادن حداکثر واجذب، هنوز جذب شـده مانده اسـت. این شـاخص، بیشینه دگرگونی زیستی مورد انتظار را بیان می‌کند و فرض می‌کنـد که یاخته‌ها تنها به مولکول‌های فاز مایع واکنش نشـان می‌دهند. منحنی BTP_t در برابر BA_t برای ۳۰= t روز را می‌توان به چهار[5] بخش دلخواه تقسـیم کرد (شکل ۳-۶). نقطه‌ای که

1. Damköhler
2. Best number
3. Bioavailability index
4. Biotransformation potential index
5. Quadrant

در بخش دوم شکل (QII) دیده می‌شود جایی است که پتانسیل دگرگونی زیستی بالا و مقاومت واجذب پایین است. این موضوع حاکی از احتمال بالای موفقیت است. در بخش اول (QI) فنانترن از نظر فیزیکی ناپایدار[1] است اما ظاهراً دگرگونی زیستی پایین بوده یا ممانعت شده است. در بخش سوم (QIII) دگرگونی زیستی محتمل است اما واجذب محدودیت دارد. در بخش چهارم (QIV) هم احتمال موفقیت بسیار پایین است چراکه دگرگونی زیستی کُند یا ممانعت شده و واجذب هم محدود است. بنابراین، می‌شود دید که کنترل توسط انتقال جرم یا انتقال جرم به اضافه فرایندهای میکروبی در بیشتر خاک‌ها عملی است.



شکل ۳-۶ تقسیم چهار بخشی شاخص پتانسیل دگرگونی زیستی (BTP) و شاخص زیست فراهمی (BA) برای فنانترن در ۳۰ خاک و در دوره ۳۰ روز (از برایدا و همکاران، ۲۰۰۴)

۳-۳-۱- ماهیت و شکل هندسی محیط پخشیدگی

خاک‌ها دارای ذرات کانی به همراه تکه‌ها یا پوششی از مواد هیومیک روی سطوح‌شان هستند. این ذرات ممکن است سیمانی شده و خاک‌دانه درست کنند. در خاک‌دانه‌ها ذرات میکروسکوپی مواد آلی با مراحل مختلف دیاژنز از مواد هیومیک جوان، تا کهنه (که در زغال نرم و سخت پیدا می‌شود) و همین‌طور کربن دوده‌ای (کربن سیاه) دیده می‌شود. انتقال جرم درون ذره‌ای ممکن است شامل

1. Labile

پخشـیدگی در سـیال منفذی (پخشـیدگی منفذی)، پخشـیدگی در طول دیوار منفذ (پخشـیدگی سـطحی) یا پخشـیدگی در ماتریکس جامد مواد آلی (پخشـیدگی فاز جامد یا ماتریکس) باشـد. در منـافـذی مـانند میکروپورها (قطر < nm ۲ طبق تعریف IUPAC) که قطر منفذ کوچک‌تر از قطر ماده پخشـیده شـونده اسـت، تمایز و تشـخیص پخشیدگی سطحی و منفذی از نظر مفهومی دشوار اسـت. پخشـیدگی مولکول به یا از مرکز ذره خاک نیازمند چند مرحله پرش یا حرکت اسـت که بایسـتی در مسیر پخشیدگی از چند سطح مشترک ذره-ذره و ذره-آب عبور کند. مقیاس طولی که در آن پخشیدگی با محدودیت سرعت روبروست، می‌تواند بسیار کوچک‌تر از شعاع ماکروسکوپی ذره باشـد و به میکرومورفولوژی ذره بسـتگی خواهد داشـت (پیگناتلو، ۲۰۰۰). یاخته‌ها نمی‌توانند به منافذی که قطر کوچکتر از μm ۱۰ دارند وارد شـوند (طبق تعریف IUPAC، منفذ بزرگ منفذی است که دهانه آن بزرگ‌تر از μm ۰/۰۵ باشد).

پخشـیدگی در منافذ با پیچیدگی شـبکه منفذی، جذب روی دیواره منافذ و ممانعت فضـایی مولکول‌ها را کُند می‌کند. ممانعت فضـایی مولکولی وقتی خود را نشان می‌دهد که کوچک‌ترین قطر مولکول حدود ۱۰ درصـد قطر منفذ باشـد و با افزایش آن به ۱۰۰ درصـد شـدید می‌شود (کارگر و راتوِن، ۱۹۹۲). برای بیشـتر مولکول‌ها، اثر ممانعت فضـایی در منافذ ریز تا منافذ متوسط کوچک‌تر مهم خواهد بود. جابه‌جایی مولکولی در طول پخشـیدگی ماتریکس در SOM نیازمند همکاری خود ماتریکس با انعطاف یا جابه‌جایی ماکرومولکول‌های هیومیک است (پیگناتلو، ۲۰۰۰). در SOM نرم (لاسـتیکی[1]) که دارای پوشـشـی از اسـید هیومیک اسـت، پخشیدگی مولکولی را سه تا چهار برابر بیشـتر از آب ممانعت می‌کند (چنگ و همکاران، ۱۹۹۷). در جامدات سـخت زنجیر (شـیشـه‌ای)، پخشـیدگی ممکن است حتی چندین برابر بیشتر باشد که به قطر مولکول و دمای شیشه‌ای شدن[2] به عنوان شـاخص اسـتحکام بستگی دارد (پیگناتلو، ۲۰۰۰). مفهوم شیشه‌ای بودن SOM در جای دیگر بحث شده است (لو و پیگناتلو، ۲۰۰۲، ۲۰۰۴a,b؛ پیگناتلو و ژینگ، ۱۹۹۶؛ سندر و همکاران، ۲۰۰۶؛ سندر و پیگناتلو، ۲۰۰۵b؛ ژینگ و پیگناتلو، ۱۹۹۷؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۱).

ناهمگنی خاک تاثیر چشـم‌گیری بر سینتیک جذب/واجذب دارد. از دیدگاه تئوری، شدت جذب و رهاسـازی رابطه عکس با مربع شـعاع ذرات دارد. در برخی پژوهش‌ها دیده شـده که سـرعت جذب/واجذب با کاهش شـعاع ذرات خاک، افزایش یافته اسـت (بال و رابرتز، ۱۹۹۱؛ کلاین آیدِم و همکاران، ۱۹۹۹؛ وو و شـوند، ۱۹۸۶). اما در برخی موارد هم وابسـتگی بین ذرات خاک و سـرعت جذب/واجذب دیده نشـده اسـت (کارول و همکاران، ۱۹۹۴؛ فارل و رینهارد، ۱۹۹۴؛ اسـتینبرگ و همکاران، ۱۹۸۷). اما روی هم رفته این گفته درسـت است که ریز بودن خاک سبب افزایش سرعت

1. Rubbery
2. Glass transition temperature

جـذب و واجـذب می‌شـــود (بـال و رابرتز، ۱۹۹۱؛ اســـتینبرگ و همکاران، ۱۹۸۷). کلاین آیدِم و همکاران (۱۹۹۹) با آزمایش جداسـازی شـن‌ها و گراول‌های رسـوبات دارای زغال سـنگ بر اسـاس انـدازه، رنـگ و تخلخـل دریافتند که با افزایش اندازه، مقدار OC و کاهش تخلخل، ســـرعت جذب کاهش می‌یابد.

بیشـــتر ترکیب‌ها در خاک‌ها هم‌دمای غیرخطی دارند. به این معنی که با افزایش غلظت تمایل جذب آن‌ها کم شده که دلیل آن ناهمگنی انرژی مکان‌های جذبی است. غیرخطی بودن جذب روی ســـرعـت جـذب و واجذب تاثیر دارد (برایدا و همکاران، ۲۰۰۱، ۲۰۰۲). در کل، ســـرعت جذب و واجذب نرمال شـده با غلظت مطلق افزایش می‌یابد. چراکه سـطح جامد (ذرات) به تدریج مقاوت در برابر پخشـــیدگی را پایین می‌آورد. با وجود اینکه منحنی‌های ســـرعت جذب و واجذب نرمال شـــده برای ترکیب‌هایی که جذب خطی دارد برهم منطبق می‌شود، اما این اتفاق در ترکیب‌هایی که جذب غیرخطی دارد تنهـا در حـالی رخ می‌دهـد که جذب و واجذب به/از منبع/مخزن نامحدود صـــورت بگیرد. در سـایر موارد در غلظت شیمیایی یکسان، واجذب بسیار کندتر از جذب بوده، و مستقیماً از اثر غلظت پیروی می‌کند که پیش‌تر نیز بدان اشـــاره شـــد. به این معنی که مکان‌های با قوی‌ترین انرژی جذب از منابع با غلظت بســیار بالا پر می‌شــوند و اما به مخازنی با غلظت نســبتاً پایین خالی می‌شوند.

جذب رقابتی هم می‌تواند سبب افزایش سرعت جذب و واجذب گونه اصلی شود. علت آن همان نقش افزایش غلظت اسـت. با افزایش غلظت گونه همراه، گونه اصـلی مکان‌های جذبی ضـعیف‌تر را اشـغال می‌کند و در محیط پخشیدگی متحرک‌تر می‌شود (وایت و پیگناتلو، ۱۹۹۹؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۱).

۳-۳-۲- تاثیر ساختار مولکولی

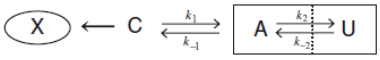
معمولاً ســـرعت جذب یا واجذب با افزایش اندازه مولکول یا آب‌گریزی آن، در خاک کاهش می‌یابد. در بیشتر پژوهش‌هایی که این اثر را نشان داده‌اند شمار کمی از ترکیب‌ها (معمولاً دو یا سه ترکیب) مورد آزمـایش قرار گرفتـه‌انـد. مطـالعـه کـارول و همکـاران (۱۹۹۴) یـک مورد جـامع از این نوع پژوهش‌هاسـت که ضـریب پخشیدگی موثر PCBs را در رسوبات بررسی کرده است. مطالعه پیت و بروسـائو (۱۹۹۸) مورد دیگری اسـت که ترکیب‌های آب‌گریز گوناگون در سـتون خاک متراکم را با مدل «دو قسـمتی» (آنی-کُند) بررسـی کرده و ضریب انتقال جرم واجذب آن‌ها را در بخش کنترل شـده سـینتیکی مقایسـه کرده اسـت. این نتایج با سازوکارهای اشاره شده در بالا (یعنی پخشیدگی منفذی، سـطحی و ماتریکس) مطابقت می‌کند که در پرتو مطالعه‌های بنیادی درباره پلی‌مرها (برنز، ۱۹۸۹؛ راجرز، ۱۹۶۵) و مواد معـدنی متخلخل مرجع (کارگر و روتون، ۱۹۹۲) انجام شـــده بود. در

باره مقایسه مولکول‌های قطبی و غیرقطبی با اندازه تقریباً یکسان، هیچ پژوهش شاخصی در خاک گزارش نشده است.

۳-۳-۳- مدل‌های تجزیه جذب-میکروبی ترکیب شده

سوبسترا با واجذب وارد محلول شده و با تجزیه زیستی از آن حذف می‌شود. مدل‌های سینتیکی تجزیه زیستی درجه اول و مونود با مدل‌های نیروی محرکه خطی درجه اول و سینتیکی جذب نوع پخشیدگی ترکیب شده‌اند. یک نمونه از هرکدام در ادامه آمده است.

مدل شلتون و دوهرتی (۱۹۹۷a،b) که درباره‌ی تجزیه ۲ و ۴ دی‌کلرو استیک اسید (2,4-D) در خاک غیراشباع مایه‌زنی شده با یک گونه *آلکالیجنز*[1] است مثالی از این گونه مدل‌هاست که در آن سینتیک مونود با سینتیک جذب/واجذب مرتبه اول ترکیب شده است. این پژوهش‌گران فرض کردند که 2,4-D سوبسترای اولیه برای رشد بوده و ماده غذایی محدود کننده است و همین‌طور رشد یا مرگ و میر طبیعی هم در باکتری رخ نداده است. مدل به صورت زیر است:



(۱۴-۳)

که در آن X ماده شیمیایی درون یاخته، C ماده شیمیایی فاز محلول، A ماده شیمیایی جذب شده فراهم و U ماده شیمیایی جذب شده نافراهم است.

رابطه ترکیب شده شامل روابط شبه مونود (شبیه روابط ۳-۴ و ۳-۵ با این تفاوت که دو عبارت آخر در رابطه ۳-۵ حذف شده است) به اضافه روابط ۳-۱۵ و ۳-۱۷ هستند.

$$\frac{dC_w}{dt} = -k_1 C_w + \frac{1}{\theta} k_{-1} S_A - \frac{\mu_{max}\, C_w}{K_m + C_w} \frac{B}{\theta}\,, \qquad (۱۵-۳)$$

$$\frac{dS_A}{dt} = -K_1 \theta C - (k_{-1} + k_2) S_A + k_{-2} S_U\,, \qquad (۱۶-۳)$$

$$\frac{dS_U}{dt} = K_2 S_A - k_{-2} S_U \qquad (۱۷-۳)$$

که در این رابطه‌ها k_1، k_{-1}، k_2 و k_{-2} $[T^{-1}]$ ثابت‌های سرعت جذب و واجذب مرتبه اول، θ $[L^3 M^{-1}]$ مقدار آب خاک و μ_{max} $[M\, M^{-1}\, T^{-1}]$ سرعت کاربرد بیشینه مونود (در این‌جا، $\mu_{max} = k_{int}$ $(K_M\ K_m)$ φ) هستند. ثابت‌های سرعت انتقال جرم در خاک سترون و پارامترهای مونود در سیستم

1. *Alcaligenes*

بدون خاک در آزمایش‌های جداگانه که به ترتیب ۳ و ۴۸ ساعت طول کشید، به دست آمدند. پس این پارامترها ویژه‌ی چارچوب زمانی همان آزمایش‌ها هستند.

مدل نیروی محرکه خطی برای فرایندهای جذب و واجذب بر اساس این ایده است که سرعت، تابعی از به تعادل رسیدن سیستم است. مدل ترکیب شده تجزیه زیستی-نیروی محرکه خطی با مثالی توسط بوسما و همکاران (۱۹۹۷) شرح داده شده است. آن‌ها تجزیه زیستی بقایای آلفا-هگزاکلروسیکلوهگزان[1] را در خاکی که سابقه آلودگی داشته مطالعه کردند. آن‌ها حضور کلنی‌های باکتریایی در منافذ نزدیک (ماکروپورهای μm ۸-۰/۳) را بدیهی دانستند که ماده تجزیه‌شونده را از منافذ دورتر که باکتری‌ها نمی‌توانستند وارد شوند، دریافت می‌کردند. آن‌ها فرض کردند که سرعت انتقال جرم q_d $[M\ T^{-1}]$ تابعی از اختلاف غلظت محلول بین منافذ دورتر، C_d و یاخته‌ها C_c $[M\ L^{-3}]$ باشد:

$$q_d = \alpha(C_d - C_c) \qquad (۱۸-۳)$$

که α $[L^3\ T^{-1}]$ پارامتر سرعت واجذب است. سرعت تجزیه زیستی، q_c $[M\ T^{-1}]$ با مدل میکائیلیس-منتن[2] مدل‌سازی شد:

$$q_c = \frac{q_{max} C_c}{K_{MM} + C_c} \qquad (۱۹-۳)$$

که شبیه مدل مونود اما بدون عبارت رشد و مرگ و میر است. در این رابطه؛ q_{max} $[M\ T^{-1}]$ سرعت بیشینه تجزیه زیستی و K_{MM} $[M\ L^{-3}]$ ثابت نیمه‌اشباع میکائیلیس-منتن است. با توجه به ماهیت مسن بودن سیستم در آزمایش بوسما و همکاران (۱۹۹۷) و غلظت کم سوبسترا، فرض ثابت بودن جمعیت تجزیه کنندگان منطقی است.

در شرایط ماندگار $q_d = q_v$، روابط ۳-۱۸ و ۳-۱۹ را برای حل کردن q $[M\ T^{-1}]$ می‌توان ترکیب کرد. در این صورت مقدار ماده دگرگون شده در واحد زمان با ترکیب انتقال جرم و تجزیه زیستی به دست می‌آید. «شاخص زیست فراهمی» (بهترین عدد)، B_n به صورت نسبت پارامتر انتقال جرم به سرعت تجزیه زیستی تعریف می‌شود:

$$B_n = \frac{\alpha}{q_{max} K_{MM}^{-1}} \qquad (۲۰-۳)$$

1. α-hexachlorocyclohexane
2. Michaelis-Menton

وقتی $B_n > 1$ باشد، سرعت واکنش توسط متابولیسم یاخته و وقتی $B_n < 1$ توسط انتقال جرم محدود می‌شود. مقدار B_n برای آلفا-هگزاکلروسیکلوهگزان در خاک ۰/۰۳ تا ۰/۰۱۶ بود که تعجب‌آور نبوده و نشان می‌دهد که سرعت تجزیه توسط انتقال جرم محدود می‌شده است.

مدل‌های دیگری نیز وجود دارند که تجزیه زیستی را با پخشیدگی درون ذره‌ای ترکیب کرده‌اند (هاوس و همکاران، ۲۰۰۶b؛ ریجنارتس و همکاران، ۱۹۹۰؛ اسکاو و الکساندر، ۱۹۹۲؛ اسکاو و هیوتسون، ۱۹۹۲). اساس این مدل‌ها قانون دوم فیک[1] است که برای پخشیدگی در شکل کروی (شکل هندسی معمول برای ذرات خاک) به صورت زیر است:

$$\frac{\partial s}{\partial t} = \frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left[r^2 D(T,s)\frac{\partial s}{\partial r}\right] \qquad (۲۱-۳)$$

که r [L] شعاع، s [M L^{-3}] غلظت حجمی کل در محیط پخشیدگی (شامل غلظت جذب شده و غلظت محلول در آب منفذی) و D(T,s) [L^2 T^{-1}] ضریب پخشیدگی است که وابسته به دما و غلظت است. غلظت متوسط جذب شده در یک محیط کروی به صورت زیر است:

$$\bar{S}(t) = \frac{3}{{r_0}^3}\int_0^{r_0} s(r,t) r^2\, dr \qquad (۲۲-۳)$$

شرایط مرزی در سطح مشترک ذره-محلول بیرونی با رابطه زیر بیان می‌شود:

$$S(t)_{r=r} = \frac{dS}{dC}C(t) \qquad (۲۳-۳)$$

که dS/dC ضریب توزیع معادل K_d در هم‌دماست. برای هم‌دماها نیز معمولاً برازش به مدل فروندلیچ انجام می‌شود پس داریم: $K_d = nK_F C^{n-1}$.

حل تحلیلی رابطه پخشیدگی با D ثابت برای ذرات کروی یکنواخت در شرایط مختلف مانند محلول بیرونی با غلظت محدود، با غلظت نامحدود، با غلظت ثابت یا متغیر و واجذب در اثر مکش[2]، موجود است (کرانک، ۱۹۷۵؛ کارگر و روتون، ۱۹۹۲). حل عددی نیز برای محیط‌های ناهمگن و شرایط با پیچیدگی بیشتر وجود دارد. به طور معمول پارامتر خروجی مدل پخشیدگی D/r_0^2 [T^{-1}] است چراکه مقیاس طول مشخصه پخشیدگی r_0 نامعلوم است.

وابستگی D با دما با رابطه آرنیوس[3] بیان می‌شود:

$$D = D_0\, e^{-E/RT} \qquad (۲۴-۳)$$

که E انرژی فعال‌سازی پخشیدگی، D_0 ثابت و R ثابت جهانی گاز است.

1. Fick's second law
2. Vacuum
3. Arrhenius

اگر هم‌دمای تعادلی غیرخطی باشد، وابستگی D به غلظت توسط شیب پتانسیل شیمیایی تعیین می‌شود (کارگر و روتون، ۱۹۹۲؛ پیگناتلو ۲۰۰۰). وقتی که هم‌دما خطی باشد و به محض اینکه غلظت به صفر نزدیک شود، D ثابت می‌شود.

هاوس و همکاران (۲۰۰۶b) منحنی‌های تجزیه یک سوبسترا با و بدون سوبسترای همراه را با استفاده از چند مدل که سینتیک جذب و تجزیه زیستی را مدل‌سازی می‌کند، رسم کردند. آن‌ها طیف گسترده‌ای از شدت‌های واجذب و تجزیه زیستی را بررسی کردند. برای مشاهده جزئیات می‌توان به مقاله آن‌ها رجوع کرد. اما آوردن چند نکته از نتایج کار آن‌ها در اینجا مفید است. پس در ادامه تجزیه زیستی یک سوبسترا با سینتیک مونود وقتی که تجزیه زیستی بدون محدودیت سرعت انجام گرفته باشد را بررسی می‌کنیم.

درکل، غلظت در فاز محلول به حالت ماندگار یا پایدار با مقدار کم می‌رسد. در همین حال، تجزیه زیستی ابتدا سریع بود که بیشتر در بخش محلول و فاز جذب شده‌ای که سریعاً به تعادل می‌رسد، رخ داد. با پیشرفت تجزیه، واجذب، سرعت تجزیه را محدود کرده و فاز تند تجزیه با فاز بسیار کُند ادامه یافت. تفاوت بین مدل نیروی محرکه خطی و مدل پخشیدگی ابتدا کم بوده ولی با گذشت زمان افزایش یافت. انتخاب یک پارامتر از مدل شدت نیروی محرکه خطی از مطالعه واجذب کوتاه مدت سبب بیش برآوردی تجزیه در زمان طولانی نسبت به مدل پخشیدگی می‌شود. اگر فرض شود که جذب خطی است، تجزیه در طولانی مدت بیش برآورد خواهد شد. اما در واقعیت جذب به صورت غیرخطی است و با گذشت زمان که غلظت کم می‌شود، تمایل جذب بیشتر (و کُندتر) می‌شود. اگر غلظت اولیه به اندازه‌ای باشد که رشد میکروبی را تحریک کند، ضریب سرعت تجزیه زیستی مشخصه $[T^{-1}]$ در ابتدا به خاطر رشد زیست توده افزایش یافته و پس از آنکه غلظت سوبسترا کم شده و مرگ و میر یاخته رخ می‌دهد، کاهش می‌یابد. این موارد در شکل ۳-۱ آمده است.

۳-۳-۴- مقاومت بالای واجذب

در دو دهه گذشته گزارش‌های زیادی (مانند بروسائو و رائو، ۱۹۸۹؛ لوثی و همکاران، ۱۹۹۷؛ پیگناتلو، ۱۹۹۰b، ۲۰۰۰؛ پیگناتلو و ژینگ، ۱۹۹۶) منتشر شده که نشان از وجود بقایای مواد شیمیایی در خاک است که این بقایا قویاً به ذرات خاک چسبیده‌اند، یعنی در برابر واجذب مقاومت می‌کنند وتا حد زیادی به تجزیه زیستی مقاوم هستند. این رفتار (مقاومت به واجذب) کاربرد عملی مهمی در کاهش طبیعی غلظت آلاینده، زیست فراهمی و زیست‌پالایی دارد (الکساندر، ۱۹۹۵، ۲۰۰۰؛ لواِهر و وبستر، ۱۹۹۷؛ پیگناتلو و ژینگ، ۱۹۹۶).

مقاومت به واجذب در نمونه‌های میدانی که در گذشته دور آلوده شده‌اند دیده شده و می‌تواند به نمونه‌های بدون آلودگی که در آزمایشگاه با افزودن یک ماده شیمیایی آزمایشی آلوده می‌شود هم قابل تعمیم باشد. مقاومت به واجذب (اگرچه به مقدار کم) حتی در مولکول‌های با جذب ضعیف مانند هیدروکربن‌های دو و سه کربنه هالوژن‌دار هم دیده می‌شود (فارل و همکاران، ۱۹۹۹؛ کومالاپاتی و همکاران، ۲۰۰۲؛ پاولوستاتیس و جگلال، ۱۹۹۱؛ پاولستاتیس و ماتاوان، ۱۹۹۲؛ پیگناتلو، b، a۱۹۹۰؛ ورث و هنسن، ۲۰۰۲). در این زمینه واژه "مقاوم" - و متضاد آن یعنی "ناپایدار"- به خوبی تعریف نشده و به چارچوب زمان و روش آزمایش بستگی دارد. با این وجود، بخشی که مقاومت زیادی به واجذب دارد جزئی نیست و در بیشتر موارد چند درصد یا بیشتر غلظت آلاینده را شامل می‌شود. نمونه‌هایی که در گذشته دور آلوده شده‌اند معمولاً غنی از بخش مقاوم هستند چون‌که به دلیل گذشت زمان طولانی از آلودگی بخش ناپایدار با تجزیه کاملاً ناپدید و حذف شده است (مراجعه به پیگناتلو و همکاران، ۱۹۹۳). نمودار تجزیه زیستی مواد شیمیایی افزوده شده در خاک سترونی که پیش از مایه‌زنی باکتری اجازه برقراری تعادل شیمیایی به آن داده شده، معمولاً دنباله‌دار شده و به بخش مقاوم در برابر تجزیه زیستی می‌رسد که با بخش مقاوم فیزیکی همبستگی دارد (برایدا و همکاران، ۲۰۰۴؛ وایت و همکاران، ۱۹۹۹؛ و مقاله‌هایی که پیگناتلو و ژینگ، ۱۹۹۶ به آن‌ها ارجاع داده‌اند). دیده شده است که بخش دارای مقاومت بالای واجذب پس از زمان کوتاه تماس یعنی حدود چند ساعت ایجاد می‌شود (کورنیلسن و همکاران، ۱۹۹۷؛ کان و همکاران، ۱۹۹۷، ۱۹۹۸؛ پیگناتلو، b، a۱۹۹۰؛ تن هولشر و همکاران، ۲۰۰۵).

یکی از قدیمی‌ترین گزارش‌های مقاومت به واجذب و بهترین نمونه آن، درباره ۱ و ۲ دی‌برومواتان است که ترکیبی فرار، با قابلیت تجزیه زیستی و حلالیت متوسط در آب است که به عنوان تدخین کننده خاک استفاده می‌شود. دیده شده که این ترکیب حداقل ۱۹ سال پس از استفاده در سطح میکروگرم بر کیلوگرم در خاک رویین باقی می‌ماند (پیگناتلو و همکاران، ۱۹۹۰؛ استاینبرگ وهمکاران، ۱۹۸۷). در مقایسه با دی‌برومو اتان نشان‌دار شده با ^{14}C که در غلظت برابر و تازه به خاک افزوده شده بود، بقایای دی‌برومو اتان قدیمی دارای نسبت توزیع (K_d) بسیار بزرگ‌تر، سرعت واجذب بسیار کندتر و تجزیه‌پذیری میکروبی بسیار کمتر بودند. پژوهش‌های دیگری نیز ترسیب بالای[1] بقایای BTEX و PAHs در زغال خاک‌های اطراف تاسیسات گاز (هاوتون و میلر، ۲۰۰۳) و BTEX و حلال‌های کلردار در خاک‌های با OC پایین را (پاولوستاتیس و جگلال، ۱۹۹۱؛ پاولوستاتیس و ماتاوان، ۱۹۹۲) گزارش کردند. یک نمونه دیگر از مقاومت شدید به واجذب در سیستم ساخته شده در کار فارل و ریهارد (۱۹۹۴) بود که مقاومت به واجذب تری‌کلرو اتان (TCE)

1. Highly sequestered

در ستون خاک را با شستن توسط N_2 در رطوبت نسبی ۱۰۰٪ بررسی می‌کردند. در این پژوهش بخش زیادی از TCE در ۱۰ دقیقه واجذب شد اما در ماه‌ها و سال‌های بعد تنها بخش اندکی واجذب شد.

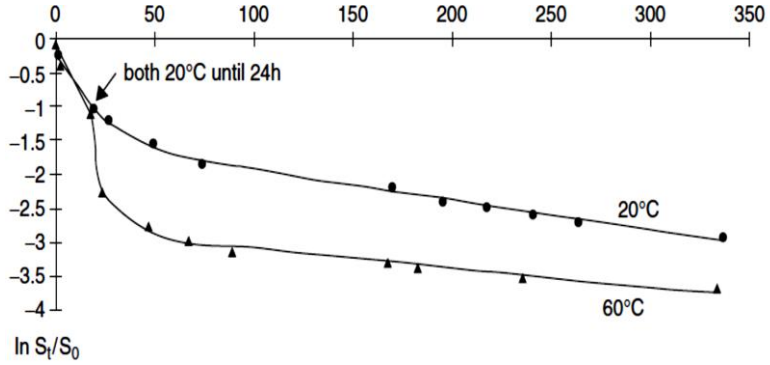
۳-۳-۵- همبستگی مقاومت واجذب با مقاومت تجزیه زیستی

در چند پژوهش از عوامل زداینده مانند تناکس یا رزین XAD برای برآورد بخش زیست فراهم استفاده شده است. از آنجا که این مواد جاذب‌های قوی هستند، فرض بر این است که در حضور این‌ها یاخته سریعاً با غلظت بسیار کمِ محلول روبه رو می‌شود. این روش برای ترکیب‌هایی که حذف آن‌ها از نظر زیستی محدودیت سرعت ندارد، رضایت‌بخش است.

کورنلیسن و همکاران (۲۰۰۰) از مدل واجذب نمایی که در حضور تناکس بخش‌های واجذبی تند، کُند و برخی اوقات بسیار کُند داشت، استفاده کردند. مدل دو بخشی (تند و کُند) به صورت زیر است:

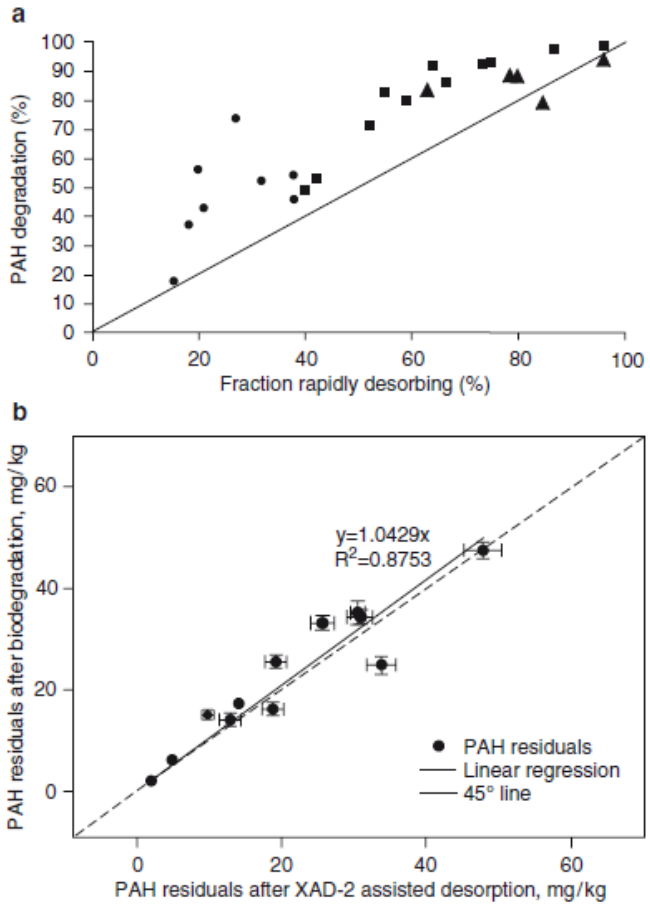
$$\frac{S_t}{S_0} = F_{fast}\, e^{-k_{fast}\, t} + F_{slow}\, e^{-k_{slow}\, t} \qquad (۳-۲۵)$$

که S_0 غلظت اولیه جذب شده، F جزء جرمی و $k\ [T^{-1}]$ ثابت سرعت برای آلاینده در اجزای تند و کُند است. تناکس به صورت متناوب از محلول برداشته شده و غلظت آلاینده در آن سنجیده می‌شود. یک نمونه از برازش رابطه ۳-۲۵ برای واجذب هگزاکلروبنزن در ۲۰ و ۶۰ درجه سلسیوس در شکل ۳-۷ آمده است (کورنلیسن و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل ۳-۷ واجذب هگزاکلروبنزن از رسوب در حضور تناکس پس از ۱۴ روز تماس با آلاینده . منحنی‌ها به رابطه ۳-۲۴ برازش داده شده‌اند (از کورنیلسن و همکاران، ۲۰۰۰).

به مدل‌هایی مانند رابطه ۳-۲۵ مدل‌های تجربی گفته می‌شـــود. با این حال، آن‌ها برای برآورد فراهمی زیستی مفیدند. کورنلیسن و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که بخش واجذب تند تناکس در تعداد زیادی از PHA ها در ســـه رســـوب آلوده مختلف، پس از پالایش با زمین‌پالایی کاهش یافت. همچنین همبســتگی نیز بین بخش تند اولیه و بخش بعدی که با زمین‌پالایی حذف شده بود، دیده شــد (شــکل ۳-۸ a) که نشــان از یک روند کلی می‌داد به این صــورت که زمین‌پالایی (فعالیتی که فرایندهای حذف در آن هم می‌تواند زیســتی باشــد و هم غیرزیســتی) موثرتر از تناکس اســت. لی و همکاران (۲۰۰۴) دیدند که همبســتگی مناســبی بین PAH ها دو تا چهار حلقه‌ای حذف شــده با موجودات بومی رســوبات در شرایط هوازی درون ارلن و بخش واجذب شده از رزین XAD-2 وجود دارد (شــکل ۳-۸ b) (درمورد PAH های پنج و شــش حلقه‌ای، باوجود اینکه مقدار قابل‌توجهی از آن‌ها واجذب شــد، اما تجزیه زیســتی چشــم‌گیری رخ نداد). اندازه‌گیری PAH های ســه تا شــش حلقه‌ای در یک بازه زمانی یکســان در ســوسپانسیون خاک دارای زغال در آب مقطر نیز همبستگی ۱:۱ بین بخش مقاوم به تجزیه زیستی (موجودات بومی) و بخش مقاوم به واجذب (تناکس) را نشان داد (لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ پیگناتلو، ۲۰۰۶). همین‌طور برایدا وهمکاران (۲۰۰۱) همبســـتگی بین بخش‌هــای مقــاوم به تجزیه زیســـتی و مقاوم به واجذب فنانترن در ۱۵ خاک ســـترون متفاوت را مشـــاهده کردند. در آزمایش آن‌ها، خاک‌ها به مدت شـــش ماه در تماس با فنانترن قرار گرفته بود و ســـپس قســـمتی از آن توســـط تناکس واجذب شـــده و قســـمتی نیز با باکتری *ســـودوموناس* که یک باکتری تجزیه کننده و قادر به استفاده از فنانترن برای رشد خود است مایه‌زنی شده بود. نکته اینجا بود که برای بیشتر خاک‌ها همبستگی ۱:۱ بود. در دوتا از این خاک‌ها بخش مقاوم به تجزیه زیستی به مقدار چشـــم‌گیری بیشـــتر از بخش مقاوم به واجذب بود که نشـــان از محدودیت ســـرعت تجزیه زیستی در آن‌ها است و در یکی دیگر از خاک‌ها هم بخش مقاوم به واجذب بیشتر بود.



شکل ۳-۸ واجذب در برابر تجزیه PCB ها در رسوبات. a) همبستگی بین درصد حذف شده با زمین‌پالایی و درصد بخش واجذب تند شده توسط تناکس (رابطه ۳-۲۴) در سه رسوب. خط به منزله همبستگی کامل (۱:۱) است (از کورنیلسن و همکاران، ۱۹۹۸). b) همبستگی بین تجزیه زیستی PAH های دو تا چهار حلقه‌ای در ارلن هوازی و واجذب توسط رزین XAD (از لی و همکاران، ۲۰۰۴).

در چندین مورد همچنین دیده شده که فراهمی زیستی فنانترن با قابلیت عصاره‌گیری آن توسط هیدروکسی پروپیل-بتا-سیکلودکسترین[1] همبستگی داشت (سِمپل و همکاران، ۲۰۰۷). اما، رودس و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه معدنی شدن فنانترن در خاک‌های دارای تا بیش از ۵ درصد کربن فعال توسط *سودوموناس* دیدند که اگرچه فراهمی زیستی با مقدار عصاره‌گیری شده توسط

1. Hydroxypropyl-β-cyclodextrin

سیکلودکسترین در نمونه‌های با صفر تا ۰/۱ درصد کربن فعال همبستگی داشت اما در خاک‌های با کربن فعال بالاتر چنین نبود و حتی با افزایش کربن فعال در خاک، معدنی شدن فنانترن با روند رو به رشدی از مقدار عصاره‌گیری شده آن بیشتر بود.

۳-۳-۶- عوامل مقاومت بالای واجذب

سازوکارهای ممکن برای تشکیل بخش‌های به شدت مقاوم شامل:

۱- فرایند معمول پخشیدگی تاخیر یافته به یا از ناحیه دورتر

۲- گیر افتادن یا به دام افتادن مولکول‌ها در منافذ بسته در طول فرایند ساخت ذرات

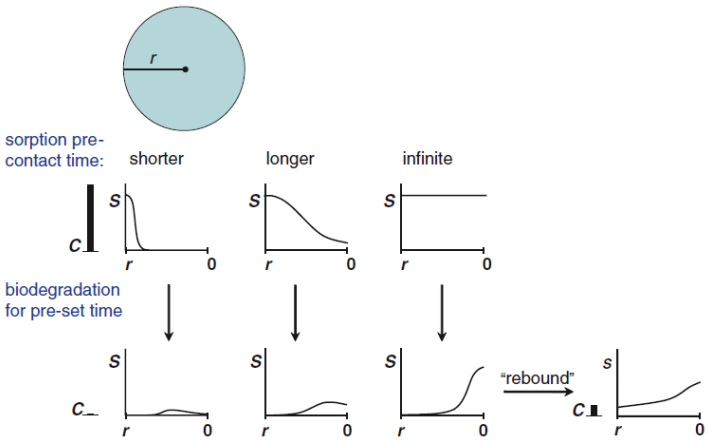
۳- تغییر ماتریکس خاک پس از جذب که سبب گیر افتادن یا به تاخیر افتادن بسیار زیاد پخشیدگی می‌شود.

مقاومت به واجذب معمولاً به تاخیر پخشیدگی در شبکه منافذ پر پیچ و خم یا فاز ماده آلی بسیار لزج[1] نسبت داده می‌شود. پیش‌روی پخشیدگی در خاک‌دانه‌های معدنی با حضور ذرات ریز ماده آلی به دام افتاده در درون خاک‌دانه‌ها به تاخیر می‌افتد (کلین آیدم و همکاران، ۱۹۹۹). همان‌گونه که اشاره شد، پخشیدگی ماتریکس نیازمند حرکت ماده پخشیده شده و ماتریکس پخشیدگی به سمت هم است. فاز SOM ممکن است در مقیاس ریز دارای بخش‌هایی باشند که تمایل زیاد به آلاینده داشته باشند اما متراکم و سخت هم باشند که موانع بزرگ اما نفوذپذیر در برابر پخشیدگی هستند. در ستون‌های راکد خاک که در معرض ترکیب‌های با آب‌گریزی بالا مانند PAH ها هستند، جذب تعادلی به سادگی برقرار نمی‌شود چراکه به دلیل آب‌گریزی، غلظت واقعی این‌ها در فاز متحرک (مانند مایع یا بخار) بسیار کم است. با کاهش مقدار رطوبت خاک، شدت جذب افزایش و پخشیدگی کاهش می‌یابد.

پخشیدگی به تاخیر افتاده می‌تواند «اثر کهنگی[2]» را توصیف کند که در آن زیست فراهمی با زمان پیش تماس شیمیایی کاهش می‌یابد (الکساندر، ۲۰۰۰). درشکل ۳-۹ برای دایره یکنواخت فرضی این پدیده توصیف شده است. پیش از تجزیه زیستی، ذره غرق شده در محلول با غلظت C، سرانجام به غظت یکنواخت جذب شده S می‌رسد. وقتی که از C به دلیل تجزیه زیستی کم شود، آلاینده دوباره به محلول نشت می‌کند. هرچه درجه تعادل به دست آمده در مرحله پیش تماس بالاتر باشد، مقدار نشت در مرحله تجزیه زیستی کمتر است. اما توجه کنید که به دلیل ماهیت تصادفی پخشیدگی، در طول مرحله تجزیه زیستی، آلاینده به درون و بیرون ذره پخشیده می‌شود. حتی در زمان پیش تماس کوتاه که در ابتدا تنها پوشش بیرونی ذره پر می‌شود، بخشی از آلاینده به

1. Highly viscous
2. Aging effect

مرکز ذره نزدیک می‌شـــود و از دید بیرونی مقاوم به تجزیه می‌شـــود. همچنین می‌شـــود احتمال «برگشـت دوباره[1]» را هم تشـخیص داد که در آن بخشی از آلاینده که در حال حاضر ترسیب یافته پس از پایان پالایش دوباره با گذشت زمان آزاد شده و در حالت فراهم قرار گیرد.



شـکل ۳-۹ مفهوم پخشـیدگی که اثر کهنگی در فراهمی زیستی آلاینده را توصیف می‌کند. فرض شده که ذرات خاک کروی یکنواخت باشند و در حالت اول با غلظت ثابت محلول C در تماس باشند. سپس در زمان تعیین شـده تجزیه زیسـتی انجام شـود و از غلظت C به مرور کاسـته شود. پس از دوره‌ی تجزیه زیستی غلظت آلاینده دوباره زیاد می‌شود. مقیاس منحنی‌ها واقعی نیست.

نمونه‌ای از گیر افتادن آلاینده در طول سـاخت ذرات، PAH های همراه با ذرات دوده ناشـی از مواد سـوختی اسـت. دوده پس از مراحل پیچیده‌ی واکنش‌های رادیکال آزاد فاز گازی تشـکیل می‌شـود که در آن PAH ها و سـایرترکیب‌ها، واسطه‌های تشکیل ذرات گرافن می‌شوند که دوده را تشکیل می‌دهد (اسمدلی و همکاران، ۱۹۹۲). این امکان وجود دارد که برخی از مولکول‌های PAH واکنش نـداده و در منـافذ درونی به دام بیافتند که بعدها به محلول پیرامونی (اگر دوده در آب قرار گیرد) دسـترسـی نداشـته باشـند. مفهوم به دام افتادن PAH در طی ساخت کربن سیاه را می‌شود فرض کرد. شواهد وجود آن تا حدی به مقاومت به واجذب برخی بخش‌های دارای PAH در شرایط نامعمول مانند دماهای بالا (هارمون و همکاران، ۲۰۰۱) یا در طول اسـتخراج سـیال فوق بحرانی (CO_2) (یانکر و همکاران، ۲۰۰۵) برمی‌گردد. به نظر می‌رسـد PAH های ذاتی رسـوبات ابتدا به همراه ذرات دوده بوده اسـت که تعادل ضـعیف با PAH افزوده شده نشان‌دار دارد (یانکر و کوالِمنز،

1. Rebound

۲۰۰۲). اگر قسمتی از PAH ها واقعا گیر افتاده باشند، عصاره‌گیری و اختصاص آن‌ها به PAH کل، ظاهراً به دلیل توان حلال به انبساط ماتریکس کربن سیاه خواهد بود (اختر و همکاران، ۱۹۸۵؛ برایدا و همکاران، ۲۰۰۳؛ رازوک و همکاران، ۱۹۶۸).

تغییر ماتریکس خاک منجر به ترسیب، کمتر مورد بررسی قرار گرفته اما پذیرفته شده است. کان و همکاران (۱۹۹۷) پیشنهاد کردند که بخشی از آلاینده که با تمایل جذبی بالا در بخش ریز[1] SOM قرار می‌گیرد و در تعادل با بخش محلول است، توسط آرایش مجدد فیزیکی و فضایی SOM ایجاد می‌شود. آن‌ها توضیحی درباره نیروهای محرک این آرایش ذکر نکرده‌اند. پس از این مقاله، پژوهش‌ها انبساط غیرالاستیک SOM را پیشنهاد کردند که می‌تواند از طریق سازوکار سفت‌شوندگی[2] سبب بی‌تحرکی شود که در آن کاهش چشم‌گیر در غلظت آلاینده جذب شده، منجر به رُمبش ماتریکس و سفت شدن آن پیرامون برخی مولکول‌ها می‌شود که قبلا فرصت فرار داشته‌اند (برایدا و همکاران، ۲۰۰۳؛ سندر و پیگناتلو، ۲۰۰۸؛ وبر و همکاران، ۲۰۰۲). این فرضیه به طور جدی آزمایش نشده است. همچنین می‌شود تصور کرد که به دام افتادن یا حداقل پخشیدگی با تاخیر زیاد به دلیل تغییر در ساختار فیزیکی ذرات در اثر واکنش با سایر مواد طبیعی باشد. برای نمونه فارل و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که بخشی از TCE و PCE که بسیار کند از سیلیکا واجذب می‌شوند با مدل‌های پخشیدگی منافذ ریز و متوسط مطابقت نمی‌کنند. در واقع آن‌ها پیشنهاد کردند که رسوب کانی سبب بستن منافذ ریز درونی سیلیس شده است.

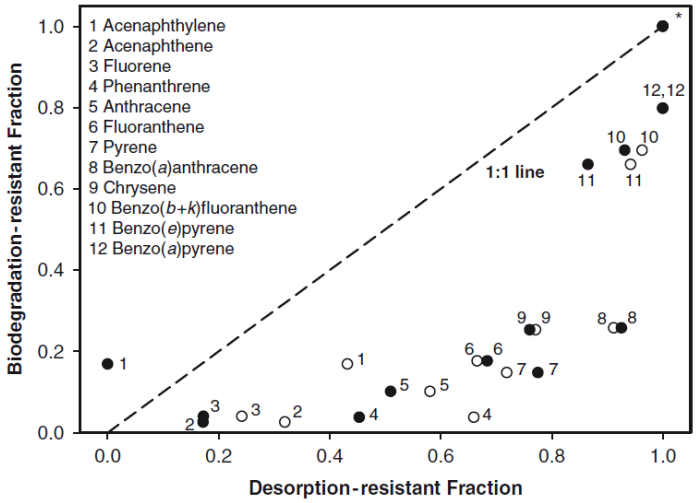
۳-۳-۷- فراهمی زیستی تسهیل شده

فراهمی زیستی تسهیل شده به توانایی موجود به دسترسی مستقیم به مولکول جذب شده یا ارتقای واجذب با تغییر ویژگی ذرات خاک و محلول پیرامونی برمی‌گردد.

مثال آورده شده در شکل ۳-۸ و متن همراه آنکه درباره‌ی همبستگی مقاومت به تجزیه زیستی و مقاومت به واجذب بود با این فرض که ریزجانداران بایستی منتظر واجذب آلاینده به محلول باشند، سازگار است. اما این فرض با یافته‌هایی به چالش کشیده شده است. از جمله اینکه به نظر می‌رسد سرعت تجزیه زیستی در برخی از جوامع میکروبی از بیشترین سرعت واجذبی که توسط زداینده‌ها در روش زدایش به دست آمده، پیشی می‌گیرد (کراکر و همکاران، ۱۹۹۵؛ گوئرین و بوید، ۱۹۹۲؛ لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ پارک و همکاران، ۲۰۰۱؛ رید و همکاران، ۲۰۰۱). نمونه بارز مطالعه لی و همکاران (۲۰۰۵) است که دریافتند فراهمی زیستی PAH در خاک آلوده به زغال سنگ دارای ریزجانداران بومی با افزودن عناصر غذایی ماکرو (پرنیاز) (NH_4^+، P، K) و میکرو (کم نیاز)

1. Micro-environments
2. Anti-plasticization

(Mg، Ca، Fe، Co، Zn، Cu، Ni، Mo، Se، W) افزایش یافت. بدون افزودن عناصر غذایی، مقدار تغییر شکل زیستی با بخش قابل واجذب توسط تناکس، در دوره ۱۰۰ روزه همبستگی تقریبی ۱:۱ داشت. اما وقتی که عناصر غذایی به محیط افزوده شدند، مقدار تغییر شکل زیستی بیشتر از بخش قابل واجذب توسط تناکس شد (شکل ۳-۱۰). مهم‌ترین نکته این آزمایش این است که مقاومت به تجزیه زیستی توسط میکروب‌های بومی خاک (حداقل در مقایسه با روش مرجع واجذب تناکس)، ممکن است تا حدی به دلیل محدودیت عناصر غذایی باشد. لازم به یادآوری است که حتی با افزودن عناصر غذایی هم بخش قابل‌توجهی از همه PAH ها مقاوم به تجزیه زیستی باقی ماند (لی و همکاران، ۲۰۰۵).



شکل ۳-۱۰ فراهمی زیستی تسهیل شده PAH ها برای میکروب‌های بومی خاک در خاک آلوده به زغال سنگ اصلاح شده با مخلوطی از عناصر غذایی معدنی. تجزیه با واجذب توسط تناکس در خاک سترون مقایسه شده است. ظروف آزمایشی واجذب دارای سیترات ۰/۰۱ مولار (دایره‌های توپر) و پیروفسفات ۰/۰۱ مولار (دایره‌های توخالی) برای تسریع واجذب بود (از لی و همکاران، ۲۰۰۵).

دلایل زیست فراهمی تسهیل شده به طور کامل روشن نیست. بیشتر باکتری‌ها در خاک به صورت پوشش زیستی[1] چسبیده به ذرات زندگی می‌کنند که دورتر از بیشتر مولکول‌های چسبیده است. یاخته‌های با قطر یک میکرومتری نمی‌توانند به منافذ متوسط (۲ تا ۵۰ نانومتر) و منافذ ریز (کمتر از ۲ نانومتر) که تقریباً همه سطح ویژه خاک را تشکیل می‌دهند، نفوذ کنند. همین‌طور آن‌ها

1. Biofilm

به SOM هم نمی‌توانند نفوذ کنند که جاذب غالب ترکیب‌های غیریونی در خاک‌ها است. بنابراین اگر یاخته‌ها بتوانند به مولکول‌های جذب شده دسترسی داشته باشند، تنها به آن‌هایی دسترسی خواهند داشت که در مجاور یاخته‌ها قرار دارند. اگرچه یک یاخته چسبیده به ذرات به مراتب به بخش جذب شده دسترسی بیشتری دارد تا غلظت محلول، اما در آنجا هم اگر تعادل موضعی میکروسکوپی برقرار باشد، پتانسیل شیمیایی برابر است. بنابراین زیست فراهمی ترمودینامیک از سطح قابل دسترس موضعی و فاز مایع موضعی بایستی برابر باشد. تنها راه افزایش زیست فراهمی، کندن مستقیم مولکول‌های جذب شده سطحی است که آن‌هم در صورتی است که سرعت جذب از سطح موضعی برابر یا بیشتر از سرعت جذب از محلول باشد. جدا از سازوکار کندن مستقیم، زیست فراهمی تسهیل شده به موارد زیر هم نسبت داده می‌شود:

- تغییر شیمی سطوح بینابینی به طوری که سبب اختلال در واکنش‌های آلاینده-خاک شود
- رهاسازی سورفکتنت‌های زیستی[۱]
- اثر غیرفعال پوشش‌های زیستی روی شیب غلظت در سطوح بینابینی (اثر خالی شدن سطح[۲])

دو منبع محتمل تغییر شیمیایی، تغییر در pH و اثر کلاته شدن است. تغییر متوسط در pH می‌تواند گونه‌بندی اسیدها و بازها که pK_a آن‌ها در همان محدوده‌ی تغییر است را عوض کند. اما احتمالا این تغییر اثر چشم‌گیری بر جذب ترکیب‌های خنثی ندارد (ژو همکاران، ۲۰۰۴). عوامل کلات کننده می‌توانند با محلول ساختن یون‌های فلزی چند ظرفیتی، سبب تسریع واجذب شوند که سبب اتصال بیشتر مواد هیومیک و به بند کشیدن مولکول‌های هیومیک در سطوح کانی‌ها می‌شود (لی و همکاران، ۲۰۰۵؛ سوبرامانیام و همکاران، ۲۰۰۴؛ یانگ و همکاران، ۲۰۰۱). اما فراهمی زیستی PAH ها برای باکتری‌های بومی یا کشت شده در خاک آغشته به زغال سنگ، تحت تاثیر افزایش سیترات یا پیروفسفات که کلات کننده‌های قوی هستند، قرار نگرفت (لی و همکاران، ۲۰۰۵). تراوش عوامل کلات کننده توسط ریشه گیاهان می‌تواند یکی از عوامل جذب تسهیل شده‌ی بقایای حشره‌کش‌های کلری باشد اما عوامل دیگر نیز محتمل است (وایت و همکاران، ۲۰۰۳). همان‌گونه که اشاره شد اسیدهای آلی طبیعی که توسط گیاهان تراوش می‌شوند ممکن است با جایگزینی رقابتی آلاینده‌ها از مکان‌های جذب، زیست فراهمی را افزایش دهند (ژینگ و پیگناتلو، ۱۹۹۸).

---

۱. Biosurfactants

2. Surface depletion effect

باکتری‌ها می‌توانند گلیکولیپید، لیپوپپتید، فسفولیپید، اسیدهای چرب و لیپیدهای خنثی تولید کنند که همگی جاذب زیستی هستند. سورفکتنت‌های سنتزی هم برای افزایش زیست فراهمی در زیست‌پالایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. سورفکتنت‌ها بسته به نوع‌شان، غلظت و دیگر شرایط می‌توانند هم سبب افزایش تجزیه زیستی شوند و هم جلوی آن‌را بگیرند (سئو و بیشاپ، ۲۰۰۷؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۷).

سورفکتنت‌ها با تشکیل میسل‌ها، میکروامولسیون‌ها یا کلوییدهایی که به عنوان دامین‌های چند بخشی کوچک عمل می‌کنند، سبب افزایش غلظت فاز آبی آلاینده می‌شوند (گوها و جافی، ۱۹۹۶؛ گوها و همکاران، ۱۹۹۸؛ شریو و همکاران، ۱۹۹۵؛ ژانگ و میلر، ۱۹۹۲). غلظت بحرانی میسل[1] (cmc) سورفکتنت‌های زیستی از یک تا ۲۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر و جرم مولکولی سورفکتنت زیستی از ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون متغیر است (گوها و همکاران، ۱۹۹۸). اگر جذب زیستی منحصراً از محلول واقعی انجام گیرد، در این صورت با استفاده از چرخه ترمودینامیک می‌شود نشان داد که زیست فراهمی کنترل شده ترمودینامیکی مستقل از حضور دامین‌های بخش‌بندی شده کوچک سورفکتنت[2] است. بنابراین، سورفکتنت تنها می‌تواند با تسریع واجذب از خاک یا تسهیل ورود به غشای زیستی، زیست فراهمی را افزایش دهد.

به نظر می‌رسد که اثر سورفکتنت بر ضریب سرعت انتقال جرم سیال‌های غیرمحلول در آب[3] (NAPL ها) (جانسون و همکاران، ۱۹۹۹) یا کریستال‌ها (هوانگ و لی، ۲۰۰۱؛ جانسون وکارلسون، ۲۰۰۴) در غلظت کمتر از cmc،کم باشد. در غلظت بیشتر از cmc حضور سورفکتنت‌ها ضریب انتقال جرم مواد شیمیایی در NAPL ها (برناردز و گوشال، ۲۰۰۸؛ جانسون و همکاران، ۱۹۹۹) و کریستال‌ها (هوانگ و لی، ۲۰۰۱) را کاهش می‌دهد (اگرچه سرعت به دلیل افزایش جزءبندی تعادلی افزایش می‌یابد). بنابراین پیش‌بینی می‌شود که سورفکتنت، واجذب از سطوح خاک را سرعت نبخشد. درباره‌ی تسهیل ورود به غشای زیستی هم پیشنهاد شده که انتقال مستقیم از فاز شبه-میسل[4] جذب شده روی سطح یاخته به درون آن رخ می‌دهد (بیل و بتز، ۲۰۰۰؛ کاپلی و فیچتر، ۱۹۹۷؛ گوها و جافی، ۱۹۹۶؛ گوها و همکاران، ۱۹۹۸).

بیشتر سویه‌های باکتریایی مواد مخاطی اگزوپلی ساکاریدی[5] (EPS) تولید می‌کنند که یاخته را در پوشش زیستی نگه می‌دارد و به اتصال پوشش زیستی به سطوح کمک می‌کند (سادرلند، ۲۰۰۱). مواد شیمیایی آب‌گریز از آب به سمت EPS می‌روند (جانسون و کارلسون، ۲۰۰۴؛ ویکی و

1. Critical micelle concentration
2. Surfactant micropartition domain
3. Non-aqueous phase liquids
4. Hemi-micellular
5. Exopolysaccharide

همکاران، ۲۰۰۷). در اینجا هم می‌توان نشـان داد که تعادل شیمیایی بین غشای یاخته و ماتریکس خاک مستقل از EPS است. در شرایط غیرتعادلی که بیشتر در منفذ یا درون پوشش زیستی تخلیه شـده از آلاینده رخ می‌دهد، ممکن است EPS به دلیل رقابت بر سر غلظت فراهمی ماده شیمیایی، غلظت در سطح غشای یاخته را کاهش دهد.

پوشـش زیسـتی تجزیه‌کنندگان PAH مسـتقیماً روی سطوح PAH رشد می‌کنند (اریکسن و همکاران، ۲۰۰۲؛ جانسـون و کارلسـون، ۲۰۰۴؛ ویک و همکاران، ۲۰۰۲). جانسـون و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که در برخی از تجزیه‌کنندگان PAH، پوشش‌های زیستی سبب کاهش کشش سـطحی مایع نمی‌شـود و همین‌طور کلوییدهای پلی‌سـاکاریدی باکتریایی با وجود افزایش حلالیت، سـرعت معدنی شدن را افزایش نمی‌دهند. این نتایج دوباره تاکید می‌کند که افزایش حلالیت راه‌کار اصلی افزایش زیست فراهمی نیست.

فرضیه خالی شدن سطحی این امر را تقویت می‌کند که پوشش‌های زیستی تجزیه کننده سبب کاهش غلظت شـیمیایی در لایه مرزی پخشـیدگی در نزدیکی سـطح خاک می‌شـود که خود سبب افزایش نیروی محرک پخشـیدگی مولکولی به سـمت بیرون از سـطح فاز جامد اسـت. این فرض با شـواهد ضـمنی تایید می‌شـود. طبق انتظار با رخ دادن تجزیه زیسـتی در فاز آبی، سـرعت حلالیت سـیال‌های غیرمحلول در آب (NAPL ها) افزایش می‌یابد (سـیگرن و همکاران، ۲۰۰۲؛ ینگ و مک‌کارتی، ۲۰۰۰). نتایج جانسـون و کارلسـون (۲۰۰۴) که درباره‌ی تشـکیل پوشـش زیستی روی کریسـتال‌های PAH بود و خاطر نشـان می‌کرد که افزایش حلالیت و سـرعت انحلال سبب افزایش فراهمی زیستی نمی‌شود، با فرایند حذف، از فرضیه تخلیه سطحی حمایت می‌کنند. به محض اینکه مولکول آلاینده سـطح بینابینی خاک را ترک کند، ماتریکس پوشـش زیسـتی-EPS محیط جذبی نسـبتاً موثری ایجاد می‌کند و مانع سـینتیکی برای رهاسـازی آن‌ها به محلول می‌شـود (ویک و همکاران، ۲۰۰۸). با افزودن سـورفکتنت‌های مصـنوعی در کمتر ازcmc آن‌ها در اتصـال پوشـش زیسـتی اختلال ایجاد می‌شـود که کاهش فراهمی زیستی را سبب می‌شود (سئو و بیشاپ، ۲۰۰۷). معمولاً از عوامـل زدایـنـده‌ای مانند حباب‌های گازی یا پلی‌مرهای سـاچمه‌ای به عنوان مرجع برای فراهمی زیسـتی اسـتفاده می‌شود که ممکن است با ایجاد شیب غلظتی کم عمق در سطح مشترک در مقایسـه با پوشـش زیستی واقعی، زیست فراهمی را کمتر برآورد کند. علت این امر ناتوانی این‌ها در نزدیک شدن هرچه بیشتر به سطح و ورود به منافذی است که می‌تواند کلونیزه شود.

۳-۴- نتیجه‌گیری

اهمیت موضوع زیست فراهمی در زیست‌پالایی و کاهش طبیعی غلظت آلاینده زیاد است. زیست فراهمی را می‌توان به طور ساده این چنین تعریف کرد: نسبت جرم آلاینده حذف شده در بود و نبود خاک در یک زمان مشخص. زیست فراهمی تابعی از رفتار انتقال جرم و ترمودینامیک آلاینده در بخش زنده و غیرزنده خاک است. یاخته‌های باکتریایی اگر نگوییم همه‌ی سوبسترا، بخش زیادی از آن را از فاز آبی جذب کرده و در درون یاخته تثبیت می‌کنند. میزان جذب، فعالیت آلاینده در فاز آبی را تعیین می‌کند. اما چیزی که مهم است نسبت توزیع آلاینده بین خاک-غشای زیستی است. این نسبت به شدت به ماهیت ذرات خاک وابسته است اما به نظر می‌رسد وابستگی ضعیفی هم با آب‌گریزی و قطبیت ماده حل‌شونده داشته باشد. جذب به خاک‌ها معمولاً غیرخطی است و با کاهش غلظت به سمت کم کردن فراهمی زیستی متمایل می‌شود. جزءبندی به سمت غشاهای زیستی خطی است و تا رسیدن مولکول به اندازه خاص با K_{ow} همبستگی دارد. به هر روی، برای مشخص کردن جذب در غشاهای زیستی واقعی و شناسایی مسیرهای اختصاصی‌تر جذب، به کارهای بیشتری نیاز است. گونه همراه از طریق جذب رقابتی و نقش‌های خاص در زیست شناسی بر زیست فراهمی تاثیر می‌گذارند. درجه جذب رقابتی با درجه غیرخطی بودن در هم‌دمای تک-گونه‌ای تعیین می‌شود. گونه همراه با افزایش یا کاهش غلظت با گونه اصلی رقابت کرده و به ترتیب سبب افزایش یا کاهش فراهمی زیستی گونه اصلی می‌شود. این اثر برای برخی از ذرات چشم‌گیر است. عملکرد فرایندهایی که سبب پسماند واقعی جذب می‌شوند، می‌تواند منجر به بیش‌برآوردی در زیست فراهمی مبتنی بر هم‌دمای جذب شود.

انتقال جرم از طریق پخشیدگی و جریان همرفت سبب انتقال مولکول آلاینده از مکان‌های دورتر به نزدیک یاخته می‌شود. اغلب انتقال جرم فرایندی محدود کننده سرعت است یا اینکه در طول زیست‌پالایی یا کاهش طبیعی غلظت آلاینده محدود کننده سرعت می‌شود. پخشیدگی فرایند پیچیده‌ای است که توسط ساختار مولکول، ماهیت و شکل هندسی محیط پخشیدگی، شیب غلظت، شرایط مرزی در سطح مشترک و دما کنترل می‌شود. کوپل شدن قوانین سرعت انتقال جرم با قوانین سرعت تجزیه زیستی تاحدی موفقیت‌آمیز بوده اما این مدل‌ها معمولاً موردی هستند. در بخشی از آلاینده مقاومت بسیار شدید به واجذب پدیده‌ای مشهود است. ساده‌ترین نتیجه آن تاخیر پخشیدگی از دامین‌های دورتر به ماتریکس خاک است. اما امکان به دام افتادن در منافذ درون ذره‌ای بسته، به عنوان سازوکار پایدار در برخی موارد نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

زیست فراهمی تسهیل شده به نظر واقعی می‌رسد اما دلایل آن به خوبی روشن نیست. نقشی که سورفکتنت‌های زیستی ایفا می‌کنند مبهم است. علت احتمالی آن نیز توسعه پخشیدگی آلاینده

از طریق تاثیر بر پوشش‌های زیستی در ناحیه سطح مشترک است. اما در این زمینه به پژوهش‌های بیشتری نیاز است.

پیش‌بینی زیست فراهمی یک آلاینده تنها از ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی آلاینده و خاک و پارامترهای تجزیه موجود زنده (در فاز آبی)، هدف مطلوبی است. شاید این هدف دست نیافتنی است و ما به آن نزدیک نیستیم. روش‌های جایگزین برای برآورد بخش فراهم زیستی جذاب هستند اما به بررسی‌های روشمند بیشتر در این زمینه مورد نیاز است. عوامل زداینده فاز جامد مانند تناکس ممکن است نتوانند شیب غلظت را در سطح مشترک آب-خاک که توسط پوشش زیستی برقرار می‌شود، شبیه‌سازی کنند. عصاره‌گیرهای فاز مایع مانند محلول سیکلو دکسترین یا حلال‌های ضعیف به آن روشی که مورد استفاده قرار می‌گیرند هم دارای اعتبار مناسبی نیستند.

منابع

Akhter M, Chughtai A, Smith D (1985) The structure of hexane soot I: spectroscopic studies. Appl Spectrosc 39:143–153.

Alexander M (2000) Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environ Sci Technol 34:4259–4265c.

Alexander M (1995) How toxic are toxic chemicals in soil? Environ Sci Technol 29:2713–2717.

Ball WP, Roberts PV (1991) Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Intraparticle diffusion. Environ Sci Technol 25:1237–1249.

Beal R, Betts WB (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in Pseudomonas aeruginosa. J Appl Microbiol 89:158–168.

Berens A (1989) Transport of organic vapors and liquids in poly(vinyl chloride). Macromol Chem 29:95–108.

Bernardez LA, Ghoshal S (2008) Solubilization kinetics for polycyclic aromatic hydrocarbons transferring from a non-aqueous phase liquid to non-ionic surfactant solutions. J Coll Interf Sci 320:298–306.

Bosma TNP, Middeldorp PJM, Schraa G, Zehnder AJB (1997) Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environ Sci Technol 31:248–252.

Braida W, Pignatello JJ, Lu Y, Ravikovitch PI, Neimark AV, Xing B (2003) Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. Environ Sci Technol 37:409–417.

Braida W, White JC, Zhao D, Ferrandino FJ, Pignatello JJ (2002) Concentration-dependent kinetics of pollutant desorption from soils. Environ Toxicol Chem 21:2573–2580.

Braida W, White JL, Pignatello JJ (2004) Indices for bioavailability and biotransformation potential of contaminants in soils. Environ Toxicol Chem 23:1585–1591.

Braida WJ, White JC, Ferrandino FJ, Pignatello JJ (2001) Effect of solute concentration on sorption of polyaromatic hydrocarbons in soil: uptake rates. Environ Sci Technol 35:2765–2772.

Brusseau ML, Rao PSC (1989) Sorption nonideality during organic contaminant transport in porous media. Crit Rev Environ Cont 19:33–99.

Carroll KM, Harkness MR, Bracco AA (1994) Application of a permeant/polymer diffusional model to the desorption of polychlorinated biphenyls from Hudson River sediments. Environ Sci Technol 28:253–258.

Chang M, Wu S, Chen C (1997) Diffusion of volatile organic compounds in pressed humic acid disks. Environ Sci Technol 31:2307–2312.

Chen J, Zhu D, Sun C (2007) Effect of heavy metals on the sorption of hydrophobic organic compounds to wood charcoal. Environ Sci Technol 41:2536–2541.

Cho YM, Smithenry DW, Ghosh U, Kennedy AJ, Millward RN, Bridges TS, Luthy RG (2007) Field methods for amending marine sediment with activated carbon and assessing treatment effectiveness. Mar Environ Res 64:541–555.

Cornelissen G, Gustafsson O (2004) Sorption of phenanthrene to environmental black carbon in sediment with and without organic matter and native sorbates. Environ Sci Technol 38:148–155.

Cornelissen G, Hassell KA, van Noort PCM, Kraaij R, van Ekeren PJ, Dijkema C, de Jager PA, Govers HAJ (2000) Slow desorption of PCBs and chlorobenzenes from soils and sediments: relations with sorbent and sorbate characteristics. Environ Pollut 108:69–80.

Cornelissen G, Rigterink H, Ferdinandy MMA, Van Noort PCM (1998) Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. Environ Sci Technol 32:966–970.

Cornelissen G, van Noort PCM, Govers HAJ (1997) Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. Environ Toxicol Chem 16:1351–1357.

Crank J (1975) The mathematics of diffusion, 2nd edn. Clarendon, Oxford, UK.

Crittenden JC, Luft P, Hand DW, Oravitz JL, Loper SW, Arl M (1985) Prediction of multicomponent adsorption equilibria using ideal adsorbed solution theory. Environ Sci Technol 19:1037–1043.

Crocker FH, Guerin WF, Boyd SA (1995) Bioavailability of naphthalene sorbed to cationic surfactant-modified smectite clay. Environ Sci Technol 29:2953–2958.

DeLapp RC, Leboeuf EJ (2004) Thermal analysis of whole soils and sediment. J Environ Qual 33:330–337.

DeLapp RC, LeBoeuf EJ, Chen J, Gu B (2005) Advanced thermal charaterization of fractionated natural organic matter. J Environ Qual 34:842–853.

Dulfer WJ, Govers HAJ (1995) Membrane–water partitioning of polychlorinated biphenyls in small unilamellar vesicles of four saturated phosphatidylcholines. Environ Sci Technol 29:2548–2554.

Eriksson M, Dalhammar G, Mohn WW (2002) Bacterial growth and biofilm production on pyrene. FEMS Microbiol Ecol 40:21–27.

Escher BI, Schwarzenbach RP (1996) Partitioning of substituted phenols in liposome–water, biomembrane–water, and octanol–water systems. Environ Sci Technol 30:260–270.

Farrell J, Grassian D, Jones M (1999) Investigation of mechanisms contributing to slow desorption of hydrophobic compounds from mineral solids. Environ Sci Technol 33:1237–1243.

Farrell J, Reinhard M (1994) Desorption of halogenated organics from model solids, sediments, and soil under unsaturated conditions. 2. Kinetics. Environ Sci Technol 28:63–72.

Gobas FAPC, Lahittete JM, Garofalo G, Shiu WY, Mackay D (1988) A novel method for measuring membrane–water partition coefficients of hydrophobic organic chemicals: comparison with 1-octanol–water partitioning. J Pharm Sci 77:265–272.

Goss K-U, Schwarzenbach RP (2001) Linear free energy relationships used to evaluate equilibrium partitioning of organic compounds. Environ Sci Technol 35:1–9.

Guerin WF, Boyd SA (1992) Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. Appl Environ Microbiol 58:1142–1152.

Guha S, Jaffé P (1996) Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. Environ Sci Technol 30:1382–1391.

Guha S, Jaffé PR, Peters CA (1998) Bioavailability of mixtures of PAHs partitioned into the micellar phase of a nonionic surfactant. Environ Sci Technol 32:2317–2324.

Harmon TC, Burks GA, Aycaguer A-C, Jackson K (2001) Thermally enhanced vapor extraction for removing PAHs from lampblack-contaminated soil. J Environ Eng 127:986–993.

Harmsen J (2007) Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. J Environ Qual 36:1420–1428.

Haws NW, Ball WP, Bouwer EJ (2006a) Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. J Contam Hydrol 82:255–292.

Haws NW, Bouwer EJ, Ball WP (2006b) The influence of biogeochemical conditions and level of model complexity when simulating cometabolic biodegradation in sorbent–water systems. Adv Water Res 29:571–589.

Hawthorne SB, Miller DJ (2003) Evidence for very tight sequestration of BTEX compounds in manufactured gas plant soils based on selective supercritical fluid extraction and soil/water partitioning. Environ Sci Technol 37:3587–3594.

Hinz C (2001) Description of sorption data with isotherm equations. Geoderma 99:225–243.

Huang HL, Lee WMG (2001) Enhanced naphthalene solubility in the presence of sodium dodecyl sulfate: effect of critical micelle concentration. Chemosphere 44:963–972.

Johnsen AR, Karlson U (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol 63:452–459.

Johnson JC, Sun S, Jaffe PR (1999) Surfactant enhanced perchloroethylene dissolution in porous media: the effect on mass transfer rate coefficients. Environ Sci Technol 33:1286–1292.

Jonker MT, Koelmans AA (2002) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soot and sediment: solvent evaluation and implications for sorption mechanism. Environ Sci Technol 36:4107–4113.

Jonker MTO, Hawthorne SB, Koelmans AA (2005) Extremely slowly desorbing polycyclic aromatic hydrocarbons from soot and soot-like materials: evidence by supercritical fluid extraction. Environ Sci Technol 39:7885–7895.

Jonker MTO, Hoenderboom AM, Koelmans AA (2004) Effects of sedimentary sootlike materials on bioaccumulation and sorption of polychlorinated biphenyls. Environ Toxicol Chem 23:2563–2570.

Kan AT, Fu G, Hunter M, Chen W, Ward CH, Tomson MB (1998) Irreversible sorption of neutral hydrocarbons to sediments:

experimental observations and model predictions. Environ Sci Technol 32:892–902.

Kan AT, Fu G, Hunter MA, Tomson MB (1997) Irreversible adsorption of naphthalene and tetrachlorobiphenyl to lula and surrogate sediments. Environ Sci Technol 31:2176–2186.

Kappeli O, Fiechter A (1977) Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast Candida tropicalis with possible relation to hydrocarbon transport. J Bacteriol 131:917–921.

Kärger J, Ruthven DM (1992) Diffusion in zeolites and other microporous solids. Wiley, New York.

Kleineidam S, Rügner H, Grathwohl P (1999) The impact of grain scale heterogeneity on slow sorption kinetics. Environ Toxicol Chem 18:1673–1678.

Kommalapati RR, Valsaraj KT, Constant WD (2002) Soil-water partitioning and desorption hysteresis of volatile organic compounds from a Louisiana superfund site soil. Environ Monit Assess 73:275–290.

Kwon JH, Liljestrand HM, Katz LE (2006) Partitioning of moderately hydrophobic endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles. Environ Toxicol Chem 25.

Kwon S, Pignatello JJ (2005) Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): pseudo pore blockage by model lipid components and its implications for N_2-probed surface properties of natural sorbents. Environ Sci Technol 39:7932–7939.

LeBoeuf EJ, Weber WJ Jr (2000) Macromolecular characteristics of natural organic matter. 1. Insights from glass transition and enthalpic relaxation behavior. Environ Sci Technol 34:3623–3631.

LeBoeuf EJ, Zhang L (2005) Thermal analytical study of carbonaceous and humic-based soil/sediment organic matter. ASA-CSSA-SSSA International Annual Meeting; Salt Lake City, UT, USA November 6–10.

Lei L, Suidan MT, Khodadoust AP, Tabak HH (2004) Assessing the bioavailability of PAHs in field-contaminated sediment using XAD-2 assisted desorption. Environ Sci Technol 38:1786–1793.

Li J, Pignatello JJ, Smets BF, Grasso D, Monserrate E (2005) Bench-scale evaluation of in situ bioremediation strategies for soil at a former manufactured gas plant site. Environ Toxicol Chem 24:741–749.

Linz DG, Nakles DV (1997) Environmentally acceptable endpoints in soil: risk-based approach to contaminated site management based on availability of chemicals in soil. American Academy of Environmental Engineers, Annapolis, MD, p 630.

Loehr RC, Webster MT (1997) In: Linz DG, Nakles DV (eds) Environmentally Acceptable Endpoints in Soil. American Academy of Environmental Engineers, Annapolis, MD, p 137.

Lu Y, Pignatello JJ (2004a) History-dependent sorption in humic acids and a lignite in the context of a polymer model for natural organic matter. Environ Sci Technol 38:5853–5862.

Lu Y, Pignatello JJ (2004b) Sorption of apolar aromatic compounds to soil humic acid particles affected by aluminum (III) ion cross-linking. J Environ Qual 33:1314–1321.

Lu Y, Pignatello JJ (2002) Demonstration of the “conditioning effect” in soil organic matter in support of a pore deformation mechanism for sorption hysteresis. Environ Sci Technol 36:4553–4561.

Luthy RG, Aiken GR, Brusseau ML, Cunningham SD, Gschwend PM, Pignatello JJ, Reinhard M, Traina SJ, Weber WJ Jr, Westall JC (1997) Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. Environ Sci Technol 31:3341–3347.

McGinley PM, Katz LE, Weber WJ Jr (1996) Competitive sorption and displacement of hydrophobic organic contaminants in saturated subsurface soil systems. Water Res 32:3571–3577.

McGinley PM, Katz LE, Weber WJ Jr (1993) A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 2. Multicomponent systems and competitive effects. Environ Sci Technol 27:1524–1531.

Nguyen TH, Goss K-U, Ball WP (2005) Polyparameter linear free energy relationships for estimating the equilibrium partition of organic compounds between water and the natural organic matter in soils and sediments. Environ Sci Technol 39:913–924.

Niederer C, Goss K-U, Schwarzenbach RP (2006a) Sorption equilibrium of a wide spectrum of organic vapors in Leonardite humic acid: experimental setup and experimental Data. Environ Sci Technol 40:5368–5373.

Niederer C, Goss K-U, Schwarzenbach RP (2006b) Sorption equilibrium of a wide spectrum of organic vapors in leonardite humic acid:

modeling of experimental data. Environ Sci Technol 40:5374–5379.

NRC (2003) Bioavailability of contaminants in soils and sediments: processes, tools, and applications. National Academies Press, Washington, DC.

Park J-H, Zhao X, Voice TC (2001) Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. Environ Sci Technol 35:2734–2740.

Patel H, Schultz TW, Cronin MTD (2002) Physico-chemical interpretation and prediction of the dimyristoyl phosphatidyl choline-water partition coefficient. J Mol Struc 593:9–18.

Pavlostathis SG, Jaglal K (1991) Desorptive behavior of trichloroethylene in contaminated soil. Environ Sci Technol 25:274–279.

Pavlostathis SG, Mathavan GN (1992) Desorption kinetics of selected volatile organic compounds from field contaminated soils. Environ Sci Technol 26:532–538.

Piatt JJ, Brusseau ML (1998) Rate-limited sorption of hydrophobic organic compounds by soils with well-characterized organic matter. Environ Sci Technol 32:1604–1608.

Pignatello JJ (2006) Fundamental issues in sorption related to physical and biological remediation of soils. In: Twardowska I, Allen HE, Häggblom MM, Stefaniak S (eds) Viable methods of soil and water pollution monitoring, protection and remediation. NATO Science Series: IV: earth and environmental sciences, vol. 69. Springer, Berlin, pp 3–23.

Pignatello JJ (2000) The measurement and interpretation of sorption and desorption rates for organic compounds in soil media. In: Sparks DL (ed) Advances in agronomy. Academic, San Diego, pp 1–73.

Pignatello JJ (1991) Competitive effects in the sorption of nonpolar organic compounds by soils. In: Baker RA (ed) Organic substances and sediments in water. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp 291–307.

Pignatello JJ (1990a) Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. I. Formation of residual fractions. Environ Toxicol Chem 9:1107–1115.

Pignatello JJ (1990b) Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. II. Mechanistic aspects. Environ Toxicol Chem 9:1117–1126.

Pignatello JJ, Ferrandino FJ, Huang LQ (1993) Elution of aged and freshly added herbicides from a soil. Environ Sci Technol 27:1663–1671.

Pignatello JJ, Frink CR, Marin PA, Droste EX (1990) Field-observed ethylene dibromide in an aquifer after two decades. J Contam Hydrol 5:195–214.

Pignatello JJ, Kwon S, Lu Y (2006) Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): attenuation of surface activity by humic and fulvic acids. Environ Sci Technol 40:7757–7763.

Pignatello JJ, Xing B (1996) Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Environ Sci Technol 30:1–11.

Radke CJ, Prausnitz JM (1972) Thermodynamics of multi-solute adsorption from dilute liquid solutions. AIChE J 18:761–768.

Razouk R, Saleeb E, Said E (1968) The heat of wetting and immersional swelling of charcoal. J Coll Interf Sci 28:487–492.

Reid B, MacLeod CJA, Lee PH, Morriss AWJ, Stokes JD, Semple KT (2001) A simple C14-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and catabolic activity. FEMS Microbiol Lett 196.

Rhodes AH, Carlin A, Semple KT (2008) Impact of black carbon in the extraction and mineralization of phenanthrene in soil. Environ Sci Technol 42:740–745.

Rijnaarts HHM, Bachmann A, Jumelet JC, Zehnder AJB (1990) Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomimeralization of a-hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. Environ Sci Technol 24:1349–1354.

Rogers CE (1965) Solubility and diffusivity. In: Fox D, Labes MM, Weissberger A (eds) physics and chemistry of the organic solid state. Interscience Publishing, New York, pp 509–635.

Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K (1999) Adsorption by powders and porous solids. Academic, San DiegoSander M, Lu Y, Pignatello JJ (2006) Conditioning annealing studies of natural organic matter solids linking irreversible sorption to irreversible structural expansion. Environ Sci Technol 40:170–178.

Sander M, Pignatello JJ (2008) Sorption irreversibility of 1,4-dichlorobenzene in two natural organic matter rich geosorbents. Environ Toxicol Chem 28:447–457.

Sander M, Pignatello JJ (2007) On the reversibility of sorption to black carbon: distinguishing true hysteresis from artificial hysteresis

caused by dilution of a competing adsorbate. Environ Sci Technol 41:843–849.

Sander M, Pignatello JJ (2005a) Characterization of charcoal adsorption sites for aromatic compounds: insights drawn from single-solute and bi-solute competitive experiments. Environ Sci Technol 39:1606–1615.

Sander M, Pignatello JJ (2005b) An isotope exchange technique to assess mechanisms of sorption hysteresis applied to naphthalene in kerogenous organic matter. Environ Sci Technol 39:7476–7484.

Schaumann GE, LeBoeuf EJ (2005) Glass transitions in peat: their relevance and the impact of water. Environ Sci Technol 39:800–806.

Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (2002) Environmental organic chemistry, 2nd edn. Wiley, New York.

Scow KM, Alexander M (1992) Effect of diffusion on the kinetics of biodegradation: experimental results with synthetic aggregates. Soil Sci Soc Am J 56:128–134.

Scow KM, Hutson J (1992) Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation: theoretical considerations. Soil Sci Soc Am J 56:119–127.

Seagren EA, Rittmann BE, Valocchi AJ (2002) Bioenhancement of NAPL pool dissolution: experimental evaluation. J Contam Hydrol 55:57–85.

Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. Environ Sci Technol 38:228A–231A.

Semple KT, Doick KJ, Wick LY, Harms H (2007) Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. Environ Pollut 150:166–176.

Seo Y, Bishop PL (2007) Influence of nonionic surfactant on attached biofilm formation and phenanthrene bioavailability during simulated surfactant enhanced bioremediation. Environ Sci Technol 41:7107–7113.

Seth R, MacKay D, Muncke J (1999) Estimating the organic carbon partition coefficient and its variability for hydrophobic chemicals. Environ Sci Technol 33:2390–2394.

Shelton DR, Doherty MA (1997a) Estimating losses of efficacy due to pesticide biodegradation in soil: model simulations. Soil Sci Soc Am J 61:1085–1090.

Shelton DR, Doherty MA (1997b) A model describing pesticide bioavailability and biodegradation in soil. Soil Sci Soc Am J 61:1078–1084.

Shreve GS, Inguva S, Gunnan S (1995) Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by Pseudomonas aeruginosa. Mol Marine Biol Biotechnol 4:331–337.

Singh A, Van Hamme JD, Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnol Adv 25:99–121.

Smedley JM, Williams A, Bartle KD (1992) A mechanism for the formation of soot particles and soot deposits. Combust Flame 91:71–82.

Steinberg SM, Pignatello JJ, Sawhney BL (1987) Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: entrapment in intraparticle micropores. Environ Sci Technol 21:1201–1208.

Subramaniam K, Stepp C, Pignatello JJ, Smets BF, Grasso D (2004) Enhancement of polynuclear aromatic hydrocarbon desorption by complexing agents in a weathered soil. Environ Eng Sci 21:515–523.

Sun XL, Ghosh U (2007) PCB bioavailability control in Lumbriculus variegatus through different modes of activated carbon addition to sediments. Environ Sci Technol 41:4774–4780.

Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147:3–9.

Ten Hulscher TEM, Vrind BA, Van den Heuvel H, Van Noort PCM, Govers HAJ (2005) Influence of long contact time on sediment sorption kinetics of spiked chlorinated compounds. Environ Toxicol Chem 24:2154–2159.

Vaes WJJ, Ramos EU, Hamwijk C, van Holsteijn I, Blaauboer BJ, Seinen W, Verhaar HJM, Hermens JLM (1997) Solid phase microextraction as a tool to determine membrane/water partition coefficients and bioavailable concentrations in in vitro systems. Chem Res Toxicol 10:1067–1072.

Weber WJ Jr, Kim SH, Johnson MD (2002) Distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 15. High-concentration co-contaminant effects on phenanthrene sorption and desorption. Environ Sci Technol 36:3625–3634.

Werth CJ, Hansen KM (2002) Modeling the effects of concentration history on the slow desorption of trichloroethene from a soil at 100% relative humidity. J Contam Hydrol 54:307–327.

Werth CJ, Reinhard M (1997a) Effects of temperature on trichloroethylene desorption from silica gel and natural sediments. 1. Isotherms. Environ Sci Technol 31:689–696.

Werth CJ, Reinhard M (1997b) Effects of temperature on trichloroethylene desorption from silica gel and natural sediments. 2. Kinetics. Environ Sci Technol 31:697–703.

White JC, Hunter M, Nam K, Pignatello JJ, Alexander M (1999) Correlation between the biological and physical availabilities of phenanthrene in soils and soil humin in aging experiments. Environ Toxicol Chem 18:1720–1727.

White JC, Pignatello JJ (1999) Influence of biosolute competition on the desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ Sci Technol 33:4292–4298.

White JC, Wang X, Gent MPN, Iannucci-Berger W, Eitzer BD, Schultes NP, Arienzo M, Mattina MI (2003) Subspecies-level variation in the phytoextraction of weathered p,p’-DDE by Cucurbita pepo. Environ Sci Technol 37:4368–4373.

Wick LY, Colangelo T, Harms H (2002) Kinetics of mass-transfer limited bacterial growth on solid PAHs. Environ Sci Technol 35:354–361

Wicke D, Bockelmann U, Reemtsma T (2008) Environmental influences on the partitioning and diffusion of hydrophobic organic contaminants in microbial Biofilms. Environ Sci Technol 42:1990–1996.

Wicke D, Bockelmann U, Reemtsma T (2007) Experimental and modeling approach to study sorption of dissolved hydrophobic organic contaminants to microbial biofilms. Water Res 41:2202–2210.

Wu S, Gschwend PM (1986) Sorption inketics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. Environ Sci Technol 20:717–725.

Xia G, Pignatello JJ (2001) Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a highorganic soil. Environ Sci Technol 35:84–94.

Xing B, Gigliotti B, Pignatello JJ (1996) Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. Environ Sci Technol 30:2432–2440.

Xing B, Pignatello JJ (1998) Competitive sorption between 1,3-dichlorobenzene or 2,4-dichlorophenol and natural aromatic acids in soil organic matter. Environ Sci Technol 32:614–619.

Xing B, Pignatello JJ (1997) Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinylchloride) and soil organic matter. Environ Sci Technol 31:792–799.

Yamamoto H, Liljestrand HM (2004) Partitioning of selected estrogenic compounds between synthetic membrane vesicles and water: effects of lipid components. Environ Sci Technol 38:1139–1147

Yang Y, Ratte D, Smets BF, Pignatello JJ, Grasso D (2001) Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. Chemosphere 43:1013–1021.

Yang YR, McCarty PL (2000) Biologically enhanced dissolution of tetrachloroethene DNAPL. Environ Sci Technol 34:2979–2984.

Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a Pseudomonas rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbiol 58:3276–3282.

Zhao D, Hunter M, Pignatello JJ, White JC (2002) Application of the dual-mode model for predicting competitive sorption equilibria and rates of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediment suspensions. Environ Toxicol Chem 21:2276–2282.

Zhao D, Pignatello JJ (2004) Model-aided characterization of Tenax-TA for aromatic compound uptake from water. Environ Toxicol Chem 23:1592–1599.

Zhao D, Pignatello JJ, White JC, Braida W, Ferrandino F (2001) Dual-mode modeling of competitive and concentration-dependent sorption and desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. Water Res Res 37:2205–2212.

Zhu D, Hyun S, Pignatello JJ, Lee LS (2004) Evidence for pi–pi electron donor–acceptor interactions between pi-donor aromatic compounds and pi–acceptor sites in soil organic matter. Environ Sci Technol 38:4361–4368.

Zhu D, Pignatello JJ (2005a) Characterization of aromatic compound sorptive interactions with black carbon (charcoal) assisted by graphite as a model. Environ Sci Technol 39:2033–2041.

Zhu D, Pignatello JJ (2005b) A concentration-dependent multi-term linear free energy relationship for sorption of organic compounds to soils based on the hexadecane dilute-solution reference state. Environ Sci Technol 39:8817–8828.

فصل چهارم

سورفکتنت‌های زیستی در زیست‌پالایی

Jonathan D. Van Hamme and Joanna Urban

۴-۱- مقدمه

در سطح یاخته، مولکول‌های آمفی‌پاتیکی[1] وجود دارند که با توجه به ماهیت آبی حیات و محیط زیست آبی، متداول و ضروری هستند. مشخصه‌ی این مولکول‌ها دارا بودن بخش‌های آب‌گریز[2] و آب‌دوست[3] یا قطبی و غیرقطبی است. در گونه‌های چند یاخته‌ای و تک یاخته‌ای، دو لایه‌های لیپیدی آمفی‌پاتیکی تکامل یافته‌اند که آب درون یاخته‌ای را از بیرونی جدا کرده و از این جداسازی برای تولید انرژی، تغلیظ نمک‌ها، بیرون راندن یا حذف مواد دورریز و سمی بهره‌برداری کرده و همچنین یک محیط کنترل شده برای ساخت مولکول‌های زیستی که اساس وراثت هستند را ایجاد می‌کنند. مولکول‌های قطبی‌ای هم در درون این دولایه لیپیدی قرار گرفته‌اند که عملکردشان متکی به مولکول‌های آمفی‌پاتیک است. پروتئین‌های انتقالی غشایی، پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون و پمپ محرک سدیم، موتور تاژک[4] و غشاهای درونی نمونه‌ای از این مولکول‌های قطبی هستند. در ساخته شدن بسیاری از مولکول‌ها مانند اسیدهای نوکلئیک که به صورت انفرادی یافت می‌شوند، قطبیت جفت باز و قند فسفاته نقش دارد.

این وجه مشترک (آمفی‌پاتیک بودن) به مولکول‌هایی که می‌توان به آن‌ها مولکول‌های کمکی گفت نیز تسری یافته است. این مولکول‌ها برای تعدیل و تسهیل فعالیت‌های گوناگون فیزیکی، شیمیایی و رفتاری درون و بیرون یاخته و در هر دو گونه موجودات تک یاخته‌ای و چند یاخته‌ای تولید می‌شوند. این مولکول‌های کمکی سورفکتنت‌های زیستی و امولسیون کننده‌های زیستی[5] هستند که امروزه به عنوان بخشی ضروری برای بسیاری از فرایندهای یاخته‌ای شناخته شده‌اند و برای کاربردهای صنعتی و درمانی به عنوان سورفکتنت‌های زیستی و دوست‌دار محیط زیست جایگزین سورفکتنت‌های شیمیایی ساخته شده مورد توجه قرار گرفته‌اند.

این فصل تاریخچه طبیعی سورفکتنت‌های زیستی میکروبی را معرفی می‌کند و بحث را با کاربرد آن‌ها در زیست‌پالایی و تجزیه زیستی ادامه می‌دهد. سپس طبقه‌بندی، ویژگی‌ها و نقش‌های فیزیولوژیکی توضیح داده خواهد شد و بحث با مثال‌هایی که اثر انتقال جرم بر تجزیه زیستی، شستشوی خاک و تولید در محل و خارج از محل سورفکتنت‌های زیستی را نشان می‌دهد، دنبال خواهد شد.

---

1. Amphipathic
2. Hydrophobic
3. Hydrophilic
4. Flagellar
5. Bioemulsifiers

۴-۲- تاریخچه طبیعی سورفکتنت‌های زیستی

۴-۲-۱- ویژگی‌ها و طبقه‌بندی سورفکتنت زیستی

از ویژگی‌های مشخصه سورفکتنت‌های زیستی، جدا بودن بخش‌های آب‌گریز و آب‌دوست درون یک مولکول است، که امکان برهم‌کنش‌های گوناگون را با سطوحی که در آن‌ها تعداد زیادی از فرایندهای حیات متمرکزند، ایجاد می‌کند. این پل‌های مولکولی لایه‌های ناسازگار فیزیکی - شیمیایی و محیط‌های آبی و غیرآبی را از طریق ویژگی‌های فعال سطحی گرد هم می‌آورند. سورفکتنت‌های زیستی تمایل به تجمع در سطوح مشترک هوا- آب، روغن- آب، سطح- هوا و سطح- آب را دارند و با بخش‌های سازگار در محیط‌های متضاد، اجتماع تشکیل می‌دهند. یک مثال کلاسیک تشکیل میسل و وزیکول سورفکتنت زیستی در محیط‌های آبی است که بدون شک یک تصویر از فرایندهای دیرینه تشکیل یاخته است. هنگامی‌که یک مولکول سورفکتنت زیستی آمفی‌پاتیک به درون محلول آبی وارد می‌شود، بخش‌های آب‌گریز در سطح آب و به طرف بالا جهت‌گیری خواهند کرد تا برهم‌کنش‌های پرانرژی با مولکول‌های قطبی آب به کمترین مقدار برسد. البته، بخش‌های آب‌دوست آن هم برای دوری از فاز گازی نسبتاً آب‌گریز بالای سطح، به محیط آبی قطبی متمایل می‌شوند. با افزوده شدن مولکول‌های سورفکتنت زیستی دیگر به سیستم این جزءبندی سورفکتنت زیستی ادامه می‌یابد، تا سطح مایع اشباع شود. در طول این فرایند، پیوندهای هیدروژنی که کشش سطحی بالایی را در سطح آب ایجاد می‌کنند مختل شده و کشش سطحی کاهش خواهد یافت. اشباع سطحی جایی است که کاهش کشش سطحی با افزودن سورفکتنت زیستی دیگر رخ نمی‌دهد و مولکول سورفکتنت زیستی که از این به بعد به آب افزوده می‌شود به درون محیط آبی رانده می‌شود.

هنگامی‌که تعدادی از مولکول‌های سورفکتنت زیستی در محیط آبی هستند، پایین‌ترین حالت انرژی بین مولکول‌های سورفکتنت زیستی و آب از طریق تشکیل میسل حاصل می‌شود، که در آن بخش‌های آب‌گریز سورفکتنت زیستی گرد هم آمده و به وسیله پوسته آب‌دوست از برهم‌کنش با آب حفاظت می‌شوند. میسل‌ها پویا هستند، و به طور مداوم شکل می‌گیرند، پراکنده می‌شوند و دوباره با وارد شدن مولکول‌های سورفکتنت زیستی جدید آرایش تازه می‌گیرند. ضرورت دارد که مولکول‌های کاملاً غیرقطبی در سیستم آبی وجود داشته باشند، که هسته میسل‌ها را تشکیل دهند. اگر مولکول‌های غیرقطبی (مانند یک فاز غیرآبی) به مقدار کافی در آب حضور داشته باشند، در این صورت ممکن است مولکول‌های سورفکتنت زیستی یک غشا واحد را در اطراف مولکول‌های آب‌گریز ایجاد کنند، که نتیجه آن تشکیل یک قطره امولسیون است. باید دو لایه از مولکول‌های سورفکتنت زیستی تشکیل شوند تا یک وزیکول با محتوای آبی ایجاد شود. روی سطوح جامد، مانند سطوح

یاخته، مولکول‌های سورفکتنت زیستی ممکن است همی‌میسل‌های[1] تک لایه‌ای یا ادمیسل‌های[2] دو لایه‌ای را تشکیل دهد. البته، در محیط غیرآبی، بخش‌های غیرقطبی سورفکتنت زیستی تغییر شکل می‌یابند به طوری‌که بخش‌های آب‌دوست از داخل به سمت هم متمایل شوند (در کنار هم قرار بگیرند). این برهم‌کنش‌های بین مولکولی و درون مولکولی و تنوع محیطی که مولکول‌های سورفکتنت زیستی با آن روبرو هستند سبب یک مجموعه‌ی به همان اندازه متنوع از عملکردهای زیستی طبیعی و کاربردهای زیست‌پالایی می‌شود که توضیح داده خواهد شد. اما در ابتدا، تنوع ساختمانی سورفکتنت زیستی میکروبی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۴-۲-۲- ویژگی شیمیایی سورفکتنت زیستی

پیشرفت آنالیزهای شیمیایی به همراه کاربردهای گسترده از ابزار پروتئومیکس[3] و ژنومیکس[4] بینش عمیق‌تری درباره‌ی ساختار شیمیایی و تنوع بیوسنتزی سورفکتنت‌های زیستی ایجاد کرده‌اند. سورفکتنت‌های زیستی باکتریایی، سیانوباکتریایی، قارچی و مخمری را می‌توان به دو گروه با وزن مولکولی پایین و بالا طبقه‌بندی کرد، یا بر اساس ویژگی‌های ساختاری اصلی تفکیک کرد. این گروه‌ها شامل اسیدهای چرب، گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها، گلیکوپروتئین‌ها و سورفکتنت‌های زیستی پلیمری و ذره‌ای هستند (دسای و بنات، ۱۹۹۷). اگرچه بر اساس بررسی‌ها روشن شده است که سورفکتنت‌های زیستی دارای یک وجه مشترک هستند و آن این است که عموماً از فراورده‌های اصلی متابولیسم مرکزی مانند اسیدهای آمینه، قندها، اسیدهای چرب و لیپیدها ساخته می‌شوند، اما لیستی از مولکول‌های سورفکتنت زیستی منحصر به فرد هم وجود دارد که روز به روز در حال گسترش است.

در میان سورفکتنت‌های زیستی‌ای که تاکنون شناسایی شده‌اند، مسلماً رامنولیپیدهای[5] تولید شده توسط باکتری‌های *سودوموناس* از دید بیوسنتز، ساختار و عملکرد بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند که دلیل آن تاریخچه‌ی طولانی مطالعه و کاربرد آن‌ها است. رامنولیپیدها از یک یا دو قند رامنوز پیوند شده به یک اسید چرب تشکیل شده‌اند که در چند مرحله‌ی آنابولیک از ساخت از نو[6] اسیدهای چرب و گلوکز-۶ فسفات تولید می‌شوند. مراحل نهایی ساخت به وسیله ژن‌های

1. Hemimicelle
2. Admicelle
3. Proteomic
4. Genomic
5. Rhamnolipids
6. De novo

RhlA، RhlB و RhlC کاتالیز می‌شـوند که بیان آن‌ها توسط یک سازوکار سنجش حد نصاب[1] القا می‌شـود. ژن RhlA سبب تولید ۳- (۳- هیدروکسی‌آلکانوییل‌اُکسی) آلکانوئیک اسیدها[2] (HAAs) از ۳-هیدروکسـیل - ACP[3] می‌شـود. ژن RhlB، L-dTDP- رامنوز و HAA ها را برای تشـکیل منورامنولیپیـدهـا ترکیـب می‌کنـد و RhlC یک رامنوز ثانویه را به ترکیب قبلی اضـــافه می‌کند تا دی‌رامنوییپید تشـکیل شـود (سُـبرون-چاوز و همکاران، ۲۰۰۵). مشـخص شـده است که سویه‌های گونـاگون باکتری طیف وســیعی از رامنولیپیدهای همولوگ را تولید می‌کنند (پرفیومو و همکاران، ۲۰۰۶) و در سـال‌های اخیر، واسطه‌های HAA خودشان به عنوان مولکول‌های سورفکتنت زیستی مهم شناسایی شده‌اند. ترمبلی و همکاران (۲۰۰۷) با به کار بردن منو و دی رامنولیپیدها و همچنین HAA های بسـیار خالص مشخص کردند که عملکردی نظیر HAA ها و رامنولیپیدها ممکن است به وسـیله خالص‌سـازی ناقص قابل شناسایی نباشند. به طور مشخص، در سویه PA14 *سودوموناس آئروجینوزا*[4]، دی‌رامنولیپیـد بـه عنوان جـاذب برای یـاختـه‌هـای هجومی عمل می‌کند، در حالی‌که HAA هـا بـه عنوان عـامـل دفع کننـده و منورامنولیپیـدهـا بـه عنوان عامل مرطوب کننده عمل می‌کننـد. این پژوهش‌گران نتیجـه‌گیری کردند که اگر در آزمایش‌های قبلی رامنولیپیدها به عنوان مواد دفعی معرفی شـده‌اند، احتمالاً به خاطر روش خالص‌ســازی بوده که ســبب باقی‌ماندن مقادیر چشـم‌گیری از HAA ها در نمونه رامنولیپید شـده اسـت. این موارد یعنی واسطه‌های بیوسنتزی با ویژگی سـورفکتنت زیستی و دشواری خالص‌سازی مولکول‌های با ساختار همانند، بدون شک سبب ایجاد توجه دوباره به دیگر گروه‌های سورفکتنت زیستی شناخته شده می‌شود و انتظار می‌رود که به عنوان یک راهنما برای مطالعه سـورفکتنت‌های زیسـتی که تازه کشـف شـده‌اند، عمل کند. با این وجود، برخی مباحث اخیر که در رابطه با ســورفکتنت‌های زیســتی بوده‌اند، تضــمین می‌کنند که جداسازی ساختاری سورفکتنت‌های زیستی منحصر به فرد به خوبی انجام می‌شود. چراکه در این‌ها از کرومـاتوگرافی گازی- طیف‌ســنجی جرمی[5]، ماتریس مبتنی بر طیف‌ســنجی جرمی زمان گریز یونیزاسـیون دفع لیزری[6] و اِن ام آر (رزونانس مغناطیسی هسته‌ای[7])، همراه با دیگر روش‌های آنالیز پیشــرفته اســتفاده می‌شــود. ســورفکتنت زیســتی در بیشــتر موارد، ســاختارهای جدید همان سـورفکتنت‌های زیسـتی شناخته شده‌ی قبلی هستند با این تفاوت که آمینو اسید، لیپید و ترکیب

1. Quorum-sensing mechanism
2. 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids
3. 3-hydroxyl-ACP
4. *aeruginosa*
5. Mass spectrometry
6. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
7. Nuclear magnetic resonance

قندی آن‌ها فرق می‌کند. فوکوئوکا و همکاران (۲۰۰۷) لیپیدهای مانوزیل اِریتریتول مونو- آسیلات[1] (MELs) دارای ۴-O-β-D- مانوپیرانوزیل-D- اریتریتول و اسیدهای چرب زنجیره متوسط (C_8 تا C_{14}) که به ترتیب بخش‌های آب‌دوست و آب‌گریز هستند را از مخمر *سودوزایما آنتارکتیکا*[2] و *پارآنتارکتیکا*[3] شناسایی کردند. مونو-آسیل همولوگ‌های پیدا شده همانندِ دیاسیل- و تری‌آسیل- مانوز لریتریتول مونو- آسیلات‌هایی هستند که قبلاً توضیح داده شد. اما ویژگی آب‌گریزی کمتر (تعادل آب‌دوست- چربی‌دوست[4] ۱۵-۱۲) (HLB) و مقدار غلظت بحرانی میسل[5] (cmc) ۱۰۰ برابر بالاتر ($۳/۶\times۱۰^{-۴}$ مولار) دارند، در حالی‌که توانایی مطلوب‌شان در کاهش کشش سطحی ($۳۳/۸mN\ m^{-1}$) را حفظ کرده‌اند. این ترکیب‌ها امولسیون‌های پایدار روغن در آب تشکیل می‌دهند و سبب تخریب غشا نمی‌شوند. یک نمونه دیگر که توانایی عالی امولسیون کنندگی روغن در آب را دارد، از سویه TG2C *آنتارکتوباکتر*[6] در فاز رشدی مرگ جدا شده است که یک امولسیون کننده برون یاخته‌ای با وزن مولکولی بالا (KDa ۲۰۰۰<) است (گوتیرز و همکاران، ۲۰۰۷). این گلیکوپروتئین سبب کاهش اندکِ کشش سطحی می‌شود و از تعدادی از قندها، قندهای آمینو، آمینو اسیدها و اسیدهای اورونیک تشکیل شده است. در این ترکیب هیچ لیپیدی شناسایی نشده است، اما شناسایی دقیق این نوع از مواد به دلیل پایداری شیمیایی سخت است.

همان‌طور که پیش‌تر توضیح داده شد، بیشتر سویه‌های تولید کننده، نوعی سورفکتنت زیستی تولید می‌کنند که بیشتر وابسته به شرایط رشدی است. لی و همکاران (۲۰۰۷) بامیلوسین A را شناسایی کردند که یک لیپوپپتید جدید دارای β- هیدروکسی- C_{13}- اسید چرب و هفت اسید آمینه است. سه تا از اسیدهای آمینه در سورفاکتین[7] که به همراه فنجیسین[8] و ایتورین[9] سه ترکیب غالب تولید شده در این سویه هستند، منحصر به سورفکتنت زیستی هستند.

سویه 3C-9 باکتری *رودوکوکوس روبر*[10]، قادر به استفاده از اِن- آلکان‌های C_5 تا C_{36} برای رشد است، و از آن‌ها اسیدهای چرب آزاد و اسید چرب کوتاه زنجیر (C_{12}، C_{14} و C_{16}) دارای گلیکولیپید تولید می‌کند، اما زمانی‌که روی سوبسترای محلول در آب مانند گلوکز، گلیسرول و ساکارز رشد کند، قادر به تولید آن‌ها نیست. سورفکتنت‌های زیستی تولیدی سویه 3C-9 که

1. Mono-acylated mannosylerythritol lipids
2. *Pseudozyma antarctica*
3. *parantarctica*
4. Hydrophile-Lipophile Balance
5. Critical micelle concentration
6. *Antarctobacter* sp.
7. Surfactin
8. Fengycin
9. Iturin
10. *Rhodococcus ruber*

زنجیره‌های اسید چرب کوتاه‌تر از گلیکولیپیدهای *رودوکوکسی*[1] داشتند، سبب افزایش حلالیت دی‌بنزوتیوفن[2]، نفتالین و فنانترن[3] شده و تجزیه آلکان در دو گونه میکروبی دیگر را افزایش دادند.

دو سورفکتنت زیستی لیپیدی جدید که به تازگی شناسایی شده‌اند از باکتری دریایی *مایروئیدِس*[4] سویه SM1 و سیانوباکتری آب شیرین *آفانیزومنون فلاساکوا*[5] جدا شده‌اند. سویه SM1 باکتری *مایروئیدِس* مخلوطی از لیپیدهای اُرنیتین[6] تولید می‌کند که قادر به امولسیون کردن روغن در گستره وسیع دما (۱۲۱-۳۰ درجه سلسیوس) و pH (۱۲-۵)، بدون فعالیت ضد میکروبی است (مانی‌رات و همکاران، ۲۰۰۶). *آفانیزومنون فلاساکوا* هم ۲-آسیلاکسی‌اتیل فسفونات[7] تولید می‌کند که بیشتر دارای اسید هگزا دکانوییک[8] و یک پیوند مفید C-P است که آنیون PO_3^- را به سر اسید چرب متصل می‌کند (کایا و همکاران، ۲۰۰۶).

همانند سایر زمینه‌ها، امروزه مفید بودن ژنومیکس در شناسایی اُپرون‌های[9] بیوسنتز کننده‌ی سورفکتنت‌های زیستی در ژنوم میکروبی ثابت شده است. موریتا و همکاران (۲۰۰۶)، هنگامی‌که درباره‌ی ریزجاندران تولید کننده MEL به عنوان بخشی از کارهایی که پیش‌تر به آن اشاره شده تحقیق می‌کردند، سویه NBRC 10877 *سودوزایما روگولازا*[10] را بر اساس تعیین توالی ژنی ناحیه جداکننده رونویسی شونده داخلی ۱ و ۲، و ژن5.8S rRNA، به عنوان یکی از تولیدکنندگان MEL در کنار دیگر تولید کننده‌های شناخته شده انتخاب کردند. البته، ژن‌های 16S به هیچ وجه به بیوسنتز سورفکتنت زیستی ارتباطی نداشتند. بنابراین برای داشتن اطلاعات بهتر در رابطه با مسیرهای متابولیکی سورفکتنت‌های زیستی شناخته شده، آنالیز این ژن‌ها یک رویکرد مستقیم خواهد بود. برای نمونه، کل توالی ژنوم *آلکانی‌وُراکس بُرکیومنسیس*[11] که یک باکتری دریایی تجزیه کننده هیدروکربن‌ها با توانایی امولسیون کنندگی نفت با کمک ترشح گلیکولیپیدها است، به تازگی منتشر شده است. دو ژن گلیکوزیل‌ترانسفراز[12] همسان با rhlB در *سودوموناس آئروجینوزا* به همراه دیگر عوامل ژنتیکی که ممکن است نقشی در تولید سورفکتنت زیستی بازی کنند، از جمله

---

1. *Rhodococci*
2. Dibenzothiophene,
3. Phenanthrene
4. *Myroides* sp.
5. *Aphanizomenon flosaquae*
6. Ornithine
7. 2-acyloxyethylphosphonate
8. Hexadecanoic acid
9. Operons
10. *rugulosa*
11. *Alcanivorax borkumensis*
12. Glycosyltransferase

OprG/OprW، OmpH و OprF/OmpA شناسایی شدند (اشنایکر و همکاران، ۲۰۰۶). با مطالعه پروتئومیکِ یاخته‌های رشد کننده روی هیدروکربن‌ها، نحوه تنظیم پروتئین آزاد کننده لیپوپروتئین (Lol) مشخص شد، که ممکن است با تولید سورفکتنت زیستی برای افزایش جذب و ورود هیدروکربن در ارتباط باشد (سابیروا و همکاران، ۲۰۰۶).

برتی و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش ژنومیک برای قرار دادن پپتید سینتتازهای غیرریبوزومی[1] جدید در پاتووار tomato DC3000 *سودوموناس سیرینگا*[2] قادر به کشف یک کلاس جدید از سورفکتنت‌های زیستی لیپوپپتیدی شدند که در جابه جایی گروهی باکتری‌ها دارای اهمیت بودند. شش لیپوپپتید شناخته شده خطی هستند، که مغایر با پپتیدهای حلقوی مشخص شده قبلی بوده و از پروتئین‌های رمز شده در یک خوشه ژن منفرد تولید شدند. این لیپواُکتاپپتیدها[3] با استفاده از ژنومیک و آنالیزهای فیزیولوژی و متابولیکی در این مطالعه شناسایی و تعیین ویژگی شده و سورفکتنت زیستی سیرینگافکتین[4] A تا F نام‌گذاری شدند.

روشن است که آگاهی از توالی ژن‌های بیوسنتزکننده سورفکتنت‌های زیستی برای این نوع پژوهش‌ها مقدم و ضروری است و برای مسیرهای بیوسنتز جدایه‌های جدید تنها غربال‌گری شیمیایی و فیزیولوژیکی باقی می‌ماند که بایستی انجام شود.

۴-۲-۳- نقش‌های فیزیولوژیکی سورفکتنت‌های زیستی

سورفکتنت‌های زیستی و امولسیون کننده‌های زیستی به وسیله انواع مختلفی از گونه‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرند تا فرایندهای شیمیایی و فیزیکی متنوعی را تسهیل کنند. در جهان میکروبی، سورفکتنت‌های زیستی به عنوان عناصر کلیدی در فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و رفتاری ارزش بالقوه‌ای در بهبود تجزیه زیستی و زیست‌پالایی دارند. در این بخش به نقش‌های فیزیولوژیک سورفکتنت‌های زیستی پرداخته می‌شود و نگاهی هم به فرایندهای زیست‌پالایی خواهد شد.

تمرکز بر این مورد برای پیش‌گویی مراحل کلیدی که سبب تجزیه زیستی، دگرگونی زیستی یا سوخت و ساز به وسیله ریزجانداران می‌شود مفید است. به بیان ساده، یک آلاینده بایستی قبل از سوخت و ساز از یک جا در بیرون یاخته به درون آن منتقل شود. برای این کار نیاز است که میکروب آلاینده را تشخیص دهد، به سمت آن حرکت کند، به آن بچسبد و با انتقال فعال یا

1. Non-ribosomal peptide synthetases
2. *syringae*
3. Lipooctapeptides
4. Syringafactin

غیرفعـال مولکول موردنظر را به درون یاخته جابه جا کند. در برخی موارد ممکن اســـت آنزیم‌های برون یاخته‌ای برای اکسـایش آلاینده پیش از جذب وارد عمل شـوند، یا ممکن اسـت اکسـیدازهای چسـبیده به غشا برای اجرای مراحل کاتابولیکی اولیه در طول فرایندهای انتقال به کار گرفته شوند (ون‌هام، ۲۰۰۴). بسـیاری از آلاینده‌ها حلالیت محدودی دارند و بیشـتر به صورت فاز آلی ثانویه در می‌آیند که مهم‌ترین عامل محدود کننده تجزیه زیسـتی اسـت. بنابراین، شاید مهم‌ترین نقش برای سـورفکتنت‌های زیسـتی در زیسـت‌پالایی کاهش کشـش سطحی بین فازهای آبی و آلی، و تشکیل میســل‌ها[1] یا نیمه محلول درآوردن[2] آلاینده باشـد. به طوری‌که یک میکروب آب‌دوســت بتواند به میسـل آب‌دوسـت که درون آن سـوبسـترای آب‌گریز جای گرفته بچسبد و با آن برهم‌کنش داشته باشـد. اهمیت اثرهای انتقال جرم روی تجزیه زیسـتی دربخش بعدی با جزییات بیشتر توضیح داده خواهد شـد.درعین حال، دیگر پیامدهای درونی، بیرونی و بین‌یاخته‌ای سـورفکتنت‌های زیستی هم در کل سـیستم یاخته‌ای توصیف می‌شود تا تنوع اثرهای دیده شده در به کار بردن سورفکتنت‌های شیمیایی و زیستی در روش‌های زیست‌پالایی، توجیه شود.

به طور کلی، عملکرد سـورفکتنت‌های زیسـتی در بسـیاری از سـطوح به ساختمان آن‌ها مرتبط اســت (ون‌هام و همکاران، ۲۰۰۶)، از آنجا که ترکیب سـورفکتنت‌های زیســتی ســرشــاراز قندها، چربی‌ها و آمینو اســیدها اســت، این احتمال وجود دارد که ســورفکتنت‌های زیســتی به عنوان مولکول‌های ذخیره‌ای (غذایی) عمل کنند. با مشـاهداتی مانند این مورد که در کمبود عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسـفر و آهن و زیاد بودن کربن، تولید سـورفکتنت زیسـتی تحریک می‌شـود، این احتمال تقویت شـده اسـت (آمزکیوا-ویگا و همکاران، ۲۰۰۷؛ ســوبرُن-چاوز و همکاران، ۲۰۰۵؛ تایک‌من و همکاران، ۲۰۰۷). این امر پیامدهایی در کاربرد سـورفکتنت‌های زیستی در زیست‌پالایی هم دارد. مثلاً سـورفکتنت‌های زیسـتی ممکن است به عنوان منابع کربن و انرژی با سوبسترا رقابت کنند.

برهم‌کنش‌های درون و برون یاخته‌ای مانند سـیسـتم درک حد نصاب و تشکیل پوشش زیستی ممکن اسـت به وسـیله سـورفکتنت‌های زیسـتی تسـهیل شـوند که دلایل آن، هم اثرهای فیزیکی مســتقیم آن‌ها روی هر فرایند و هم اثر غیرمســتقیم آن‌ها روی بیان ژن اســت. در این زمینه نیز می‌توان دوباره به سـورفکتنت‌های زیسـتی تولید شـده توسط *سودوموناس آئروجینوزا* (HAA ها و رامنولیپیدها) اشــاره کرد که به دلیل پیامدهای زیســت محیطی و بهداشــتی این باکتری، یکی از بهترین مثال‌ها است. این سورفکتنت‌های زیستی در گسترش ساختار پوشش زیستی، شامل تشکیل میکروکلنی اولیه، تشـکیل پوشـش وابسـته به تحرک، نگه‌داری کانال‌های باز درون پوشـش زیستی

1. Micellization
2. Pseudosolubilization

بالغ، و انتشار پوشش زیستی شرکت می‌کنند (پامپ و تالکر- نیلسن ۲۰۰۷). این موارد به وسیله پیامدهای فعال سطحی سورفکتنت زیستی و برهم‌کنش سورفکتنت زیستی با مولکول‌های خودالقاگر سیستم درک حد نصاب تسهیل می‌شوند، زیرا تشکیل پوشش زیستی به سیستم درک حد نصاب وابسته است. برای نمونه، تشکیل پوشش زیستی و تولید رامنولیپید وابسته به سیگنال‌های خودالقاگر مولکول‌هایی مانند کوئینولون‌های[1] *سودوموناس* است (PQS یا ۲-هپتیل-۳- هیدروکسی- ۴- کوئینولون[2]). آزمایش‌هایی که با PQS نسبتاً محلول انجام شد، نشان داد که رامنولیپید حلالیت و فعالیت زیستی PQS را افزایش می‌دهد و بنابراین سبب بیشتر شدن تولید رامنولیپید می‌شود (کالفی و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین با تجزیه زیستی آلاینده، به نظر می‌رسد که در غلظت‌های بالای رامنولیپید، فعالیت PQS کاهش می‌یابد، که احتمالاً به دلیل ترسیب میسل‌ها است.

همین‌طور، سورفکتنت‌های زیستی با جلوگیری از دسترسی ریزجانداران به مواد سمی آلی و فلزها، می‌توانند نقش حفاظتی داشته باشند که سبب کاربردشان در ترسیب فلز می‌شود. به همان اندازه که سورفکتنت‌های زیستی می‌توانند از طریق میسلی کردن، سوبسترا را تغلیظ کنند که امکان جذب آن را بالا می‌برد، همین‌طور با دور شدن از سطح یاخته توانایی کاهش دسترسی به ترکیب‌های نامطلوب را نیز دارند. برای نمونه، سورفکتنت زیستی تراوش شده از یاخته ممکن است سطح یاخته را آب‌گریز کند تا از برهم‌کنش یاخته با میسل‌های قطبی یا فازهای نامحلول با پوشش بیوامولسیونی جلوگیری شود.

یکی دیگر از ابزارهای میکروبی برون‌ریزهای[3] آن‌ها است که برای کاهش آسیب مولکول‌های غیرسودمند، مانند هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها به کار می‌رود. از دید زیست‌پالایی، میکروب‌های توانمند در برون‌ریزی حلال‌ها مهم هستند. زیرا آن‌ها قادر به تنظیم سطوح درون یاخته‌ای حلال‌های تخریب کننده غشا در طول سوخت و ساز هستند. پمپ‌های بروز با سرعت بالا در حال شناسایی و تعیین ویژگی هستند، اما هنوز شواهدی مبتنی بر اینکه پمپ‌ها با سورفکتنت زیستی فعال شوند، گزارش نشده است. گفته می‌شود که، ریزجانداران تولید کننده سورفکتنت زیستی به عنوان یک عامل تخریب کننده موجودات رقیب، به عنوان مثال لیپوپپتیدهای حلقوی *باسیلوس سابتیلیس*[4]، ممکن است پمپ‌های برون‌ریز سورفکتنت‌های زیستی را به عنوان ابزارهای خود مقاومتی بیان کنند (تسوگه و همکاران، ۲۰۰۱).

---

1. Quinolone
2. 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone
3. Efflux
4. *Bacillus subtilis*

همان‌طور که در بالا اشـاره شد، برهم‌کنش میکروب- سورفکتنت زیستی- آلاینده تا حدودی به وسـیله ویژگی‌های آب‌گریزی هر کدام از این سـه مورد تعیین می‌شـود. ریزجانداران در کوتاه مدت انعطاف‌پذیری زیادی در فیزیولوژی خود نشـان می‌دهند و سـورفکتنت‌های زیستی نقش‌های مهمی را در تمایز یاخته‌ای بازی می‌کنند. تشـکیل میسـلیوم‌های قارچی و هیف هوایی باکتریایی غالباً به وسـیله سورفکتنت‌های زیستی انجام می‌شود و فعالیت‌های تحریک‌کنندگی آن‌ها با نوع باکتری‌ها و قارچ‌ها فرق می‌کند (اسـتریت و همکاران، ۲۰۰۶؛ وسـلز، ۱۹۹۷). در باکتری‌ها، ویژگی آب‌گریزی سـطح یاخته از طریق تغییر در ترکیب لیپید، بیان پروتئین‌های سطحی آب‌گریز، اتصال ترکیب‌های برون یاخته‌ای مانند آلکان‌ها و انسـداد، جذب سـطحی یا عملکرد مولکول‌های سـورفکتنت زیسـتی تنظیم می‌شـود (سُـکولُسـکا و همکاران، ۲۰۰۳؛ سلطانی و همکاران، ۲۰۰۴). لیپوپلی‌ساکاریدها که بخش آب‌گریز کلیـدی در دیواره یـاخته‌های باکتریایی هسـتند، می‌توانند عامل مهم تعیین کننده آب‌گریزی در سـطح یاخته باشـد. هنگامی‌که سـورفکتنت زیستی از بیرون به محیط اضافه می‌شود می‌توانـد لیپوپلی‌سـاکارید را از دیواره‌های یاخته‌ای بردارد و از این طریق بر آب‌گریزی یاخته تاثیر بگذارد (ال‌تاهان و همکاران، ۲۰۰۰).

این پدیده جالب، به همراه توانایی ایجاد اختلال در غشـا، ممکن است در رفتار برهم‌کنش منفی ریزجانداران (یعنی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی) نقش داشته باشد، که در هر دو پدیده تولید سورفکتنت زیستی هم نقش دارد (رودریگز و همکاران، ۲۰۰۶a). تایک‌من و همکاران (۲۰۰۷) گروه ژنی بیوسـنتز کننده اسـید یوسـتیلاجیک[1] در قارچ *یوسـتیلاگو مایدیس*[2] را توصـیف کردند. جهش در این گروه ژنی سـبب از بین رفتن توانایی این قارچ بازیدیومیسـت[3] بیماری‌زای گیاهی در جلوگیری از عفونت *بوتریتیس سـینرآ*[4] در برگ‌های گوجه فرنگی شـد، که بیانگر نقش برهم‌کنشـی منفی لیپید سـلوبیوز ترشـح شـده اسـت. دی‌بُد و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از جهش ژنی، نشان دادنـد کـه اثر برهم‌کنش منفی گونـه‌هـای بـاکتری جنس *سـودوموناس* در مقابل پاتوژن گیاهی *ورتیسـیلیوم*[5] با وسـاطت سـورفکتنت زیسـتی انجام می‌شود. این سورفکتنت زیستی می‌تواند سبب کلونیزاسـیون میکرواسـکلروت[6] توسـط *سـودوموناس* شـود، غشـای یاخته را تخریب کند، سـبب آزادسازی مولکول‌های ذخیره چربی قارچ شود و با میسلی کردن فنازین-۱ کربوکسیلیک اسید [7] که

1. Ustilagic acid
2. *Ustilago maydis*
3. Basidiomycetous
4. *Botrytis cinerea*
5. *Verticillium*
6. Microsclerota
7. Phenazine-1-carboxylic acids

در غشـا محلول است و تولید رادیکال آزاد می‌کند، سمیت آن‌را افزایش دهد. از این مثال‌ها می‌توان دریافت که سـورفکتنت‌های زیسـتی بر سـاختار اجتماع تاثیر دارند و می‌دانیم که زیسـت‌پالایی در دنیای واقعی متکی به جوامع مختلط میکروبی است.

در محیط‌های زیرسطحی، درک انتقال آلاینده بیشترین اهمیت را دارد و درک انتقال میکروبی، با هدف توسـعه روش‌هایی برای افزایش حرکت میکروبی از طریق محیط‌های زیرسـطحی، دارای اولویت اسـت. ارتباط‌های بین ژن‌های کموتاکتیک[1] و اُپرون‌های تجزیه زیستی شرح داده شده است (پـارالیز و هـاروود، ۲۰۰۲)، کـه با توجه به هزینه‌های بالای انرژی در ارتباط با جابه جایی، تمرکز آن‌ها به اهمیت جابه جایی در فرایندهای تجزیه زیسـتی اسـت. ریزجانداران متحرک و حسـاس توانـایی جسـتجوی مواد غـذایی جـدیـد را دارنـد و می‌تواننـد خود را در معرض غلظت مناسـب ترکیب‌های سـمی قرار دهند. سـورفکتنت‌های زیسـتی در حالت‌های مختلف جابه جایی مرتبط با سـطح کلونیزاسـیون و تشـکیل پوشـش زیسـتی درگیر هستند. ساز و کار سیستم درک حد نصاب می‌تواند در تولید سـورفکتنت زیسـتی، تشکیل پوشش زیستی، و حتی بیان ژن‌های فلاژلین نقش مهمی داشـته باشـد (تاگوچی و همکاران، ۲۰۰۶). برای نمونه، سـورفکتنت زیسـتی سبب گسترش بیشتر باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در محیط از راه کاهش کشش سطحی و افزایش مرطوب شدن[2] شـده (لکلر و همکاران، ۲۰۰۶)، سـبب تقویت جابه جایی گروهی *سـودوموناس سـیرینگا* پاتووار tomato DC3000 شـده (برتی و همکاران. ۲۰۰۷)، و سـبب افزایش جابه جایی کششی با واسطه پیلی نوع IV (پامپ و تولکر- نیلسـن، ۲۰۰۷) و جابه جایی سـوارمینگ تاژکی در *سـودوموناس آئروجینوزا* (ترمبلی و همکاران، ۲۰۰۷) می‌شـود. بنابراین، در حالی‌که در بیشـتر منابع به اثرهای سورفکتنت زیستی و سورفکتنت روی تجزیه زیستی به صورت مبهم اشاره شده و اجماع عمومی هم دربـاره آن‌هـا وجود نـدارد، می‌توان ادعا کرد که با توجه به تنوع در جهان میکروبی، تنوع نقش‌های سورفکتنت زیستی هم مورد انتظار است.

1. Chemotactic
2. Wettability

۴-۳- کاربردهای سورفکتنت زیستی در زیست‌پالایی

منابع و کاربردهای مختلف در جدول ۴-۱ نشان داده شده است.

جدول ۴-۱ منابع و کاربردهای سورفکتنت زیستی

گروه	سورفکتنت	ریزجاندار	کاربرد/ فعالیت	منبع
	لیپیدهای ترهالوز	*آرتروباکتر پارافینیوس*[1]، *کورینه باکتریوم*[2]، *مایکوباکتریوم*[3]، *رودوکوکوس اریتروپولیس*[4]، *نوکاردیا*[5]	آرایشی و بهداشتی، ضد قارچ، ضد ویروس بازیافت و زیست‌پالایی نفت	سینگ و همکاران (۲۰۰۷)، پنگ و همکاران (۲۰۰۶)
گلیکولیپید	رامنولیپیدها	*سودوموناس آئروجینوزا*، *سودوموناس*، *سراشیا روبیدا*[6]	بازیافت نفت،حذف فلزها، حذف هیدروکربن‌ها، حذف PAH	بای و همکاران (۱۹۹۷)، مولیگان و همکاران (۲۰۰۱)، رحمان و همکاران (۲۰۰۳)، سانتاآنا و همکاران (۲۰۰۷)، وانگ و همکاران (۲۰۰۷)
	لیپیدهای سوفوروس	*کاندیدا آپیکولا*، *کاندیدا بامبی کولا*، *کاندیدا لیپولیتیکا*، *کاندیدا بوگورینسیس*[7]، *رودوکوکوس*	حذف هیدروکربن‌ها، حذف فلزها	مولیگان و همکاران (۲۰۰۱)
	گلیکولیپیدها	*اریتروپولیس*، *سراشیا مارسِسنس*[8]، *سوکامورلا*[9]	زیست‌پالایی نفت	پنگ و همکاران (۲۰۰۶)

1. *Arthrobacter paraffineus*
2. *Corynebacterium* spp.
3. *Mycobacterium* spp.
4. *erythropolis*
5. *Nocardia* sp.
6. *Serratia rubidea*
7. *Candida apicola, C. bombicola, C. lipolytica, C. bogoriensis*
8. *S. marcescens*
9. *Tsukamurella* sp.

ادامه جدول ۴-۱ منابع و کاربردهای سورفکتنت زیستی

گروه	سورفکتنت	ریزجاندار	کاربرد/ فعالیت	منبع
	لیپوپلی-ساکاریدها	*اسینتوباکتر کلکواستیکوس*[1] (RAG1)، *سودوموناس، کاندیدا لیپولیتیکا*	فراهمی زیستی سطوح	وان‌هام و همکاران (۲۰۰۶)
	لیپیدهای مانوز لری تریتول مونو-آسیلات (MEL ها)	*سودوزایما*	امولسیون کننده‌های نفت	فوکوئوکا و همکارن (۲۰۰۷)
	سورفاکتین	*باسیلوس سابتیلیس*، *باسیلوس پومیلیس*[2]	پالایش فلز	مولیگان و همکاران (۲۰۰۱)
	آرتروفاکتین[3]	*سودوموناس* MIS38	امولسیون کننده نفت	موریکاوا و همکاران (۲۰۰۰)
لیپوپپتیدها	لایچنسین A، لایچنسین B	*باسیلوس لکینیفورمیس*[4]	پالایش فلز	زیوبولس و همکاران (۲۰۰۳)
	بامیلوسین[5]	*باسیلوس آمیلولیکوفاسینس*[6]	امولسیون-سازی نفت	لی و همکاران (۲۰۰۷)
	سیرینگافاکتین A-F[7]	*سودوموناس سیرینگا* پاتووار گوجه فرنگی DC3000	حرکت تهاجمی	برتی و همکاران (۲۰۰۶)

1. *Acinetobacter calcoaceticus*
2.*pumilus*
3.Arthrofactin
4.*licheniformis*
5.Bamylocin
6.*amyloliquefaciens*
7.Syringafactin

ادامه جدول ۴-۱ منابع و کاربردهای سورفکتنت زیستی

گروه	سورفکتنت	ریزجاندار	کاربرد/ فعالیت	منبع
	لیپیدهای اُرنیتین	*مایروئیدس* سویه SM1	امولسیون‌سازی نفت	مانیرات و همکاران (۲۰۰۶)
پپتیدها	پپتیدهای لیزین، اُرنیتین	*تیوباسیلوس تیواکسیدنس*[1]، *استرپتومایسس سیویائنسیس*[2]، *گلوکانوباکتر سرینوس*[3]	امولسیون‌سازی نفت	مانیرات و همکاران (۲۰۰۶)
	لانتی‌بیوتیک‌ها	*استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سالیواریوس*[4]	فعالیت آنتی-بیوتیکی	ویلی و وان دردُنک (۲۰۰۷)
	استرپتوفاکتین	*استرپتومایسس*	هوایی	استریت و هماران (۲۰۰۶)
	فسفولیپیدها	*اسینتوباکتر*	توانایی ضد امولسیون کنندگی	استریت و هماران (۲۰۰۷)
لیپیدها	اسیدهای چرب (کُرینومایکولیک اسیدها[5]، اسپیکیولیسفوریک اسیدها[6] و غیره)	*کاپنوسایتوفاگا*[7]، *پنیسیلیوم اسپیکولی اسپوروم*[8]، *کورینه باکتریوم لپوس*[9]، *آرتروباکتر پارافینیوس*، *تالارامایسس تراکی اسپرموس*[10]، *نوکاردیا اریتروپولیس*	افزایش استحصال نفت	ماکار و کامی‌اُترا (۲۰۰۲)
		رودوکوکوس اریتروپولیس سویه3C-9		پنگ و همکاران (۲۰۰۶)

1. *Thiobacillus thiooxidans*
2. *Streptomyces sioyaensis*
3. *Gluconobacter cerinus*
4. *Streptococcus mutans, salivarius*
5. Corynomycolic acids
6. Spiculisporic acids
7. *Capnocytophaga* sp.
8. *Penicillium spiculisporum*
9. *lepus*
10. *Talaramyces trachyspermus*

ادامه جدول ۴-۱ منابع و کاربردهای سورفکتنت زیستی

گروه	سورفکتنت	ریزجاندار	کاربرد/ فعالیت	منبع
گلیکوپروتئین	آلیسان[1]	*اسینتوباکتر رادیورزیستنس*[2]	تجزیه زیستی فنانترین، فلورانتن، پیرن	مولیگان (۲۰۰۵)
	بایوسر PM	*سودوموناس مالتوفیلا*[3]	توانایی امولسیون کنندگی	بُدور و همکاران (۲۰۰۳)
	سورفکتنت ذره‌ای[4] (PM)	*اسینتوباکتر کلکواستیکوس*	افزایش انتقال جرم	رُزن‌برگ (۱۹۹۳)

۴-۳-۱- اثرهای انتقال جرم در زیست‌پالایی

انتقال جرم آلاینده به درون یاخته میکروبی یک عامل تعیین کننده مهم در سرعت و دامنه‌ی زیست‌پالایی است. بسته به فیزیولوژی میکروب‌های درگیر، اثر سورفکتنت زیستی بر انتقال جرم ممکن است مثبت یا منفی باشد و یا اصلاً تحت تاثیر قرار نگیرد. همان‌طور که در بالا بحث شد، نوع این پیامدها از پاسخ‌های فیزیولوژیکی ناشی می‌شوند. افزون براین، باید توجه کرد که پیش از جذب، ریزجانداران از سه فرایند عمومی به سوبسترا نزدیک می‌شوند. در ابتدا، میکروب ممکن است با یک سوبسترای محلول روبه رو شود که به راحتی برای جذب فعال یا غیرفعال قابل دسترس است. دوم، میکروب ممکن است به سوبسترای بسیار کم محلول در آب که در میسل‌های سورفکتنت زیستی نیمه‌محلول است دسترسی داشته باشد. سوم، میکروب ممکن است یک سطح یاخته‌ای آب‌گریز را به منظور چسبیدن مستقیم به فاز مایع غیرآبی (یا غلیظ) یا جامد تراوش کند و سوبسترا را از آن فاز استخراج کند (ون‌هام و همکاران، ۲۰۰۳).

عموماً میسل‌های سورفکتنت زیستی می‌توانند انتقال جرم را به خاطر زیادکردن حلالیت نسبی آلاینده در محیط‌های آبی، افزایش دهند (داس و موکرجی، ۲۰۰۷). هیکی و همکاران (۲۰۰۷) مشخص کردند که سورفکتنت زیستی تا حدود زیادی واجذب هیدروکربن پلی‌آروماتیک را از خاک افزایش داده و سبب تقویت تجزیه زیستی PAH های چهار حلقه‌ای به وسیله *سودوموناس آلکالیجنز* PA-10 شد. باوجود اینکه سورفکتنت زیستی چسبندگی ریزجاندار به فلورانتن جامد را کاهش داده بود، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بیشتر شدن تجزیه زیستی درست در محدوده‌ی

1. Alasan
2. *radioresistens*
3. *maltophilia*
4. Particulate surfactant

بالاتر از غلظت بحرانی میسل می‌تواند به دلیل ترکیبی از افزایش زیست توده و حلالیت باشد. زیرا سورفکتنت زیستی می‌تواند به عنوان منبع کربن عمل کند و توسط میکروب‌ها مصرف شود.

ممکن است که میسل‌های سورفکتنت زیستی به غشاهای میکروبی رسیده و مولکول‌های آلاینده را مستقیماً به غشا خارجی یک یاخته تحویل دهند (میلر و بارثا ۱۹۸۹). البته اگر غلظت میسل بسیار بالا باشد، آلاینده ممکن است به طور موثری رقیق شود که سبب کاهش انتقال جرم به دلیل جزءبندی قوی‌تر به درون فاز میسلی می‌شود. براون (۲۰۰۷) یک مدل ریاضی ارائه کرده است که امکان ترکیب جذب مستقیم سوبستراهای آب‌گریز از فاز آبی، انتقال سوبسترای میسلی به همی‌میسل‌های جذب سطحی شده روی سطح یاخته‌ای که سوبسترا را به یاخته تحویل می‌دهد، و احتمال شکست تشکیل همی‌میسل و در نتیجه ترسیب سوبسترا از یاخته را درنظر می‌گیرد. از این مدل، می‌توان عملکرد بهینه غلظت سورفکتنت را با توجه به غلظت سورفکتنت میسلی و غلظت سوبسترای زیست فراهم تعیین کرد. براون (۲۰۰۷) همچنین اشاره می‌کند که اگر یاخته از قبل با بیشترین نرخ تجزیه زیستی وارد شود، با افزودن سورفکتنت حتی اگر انتقال جرم هم افزایش یابد، سبب افزایش سینتیک تجزیه زیستی نمی‌شود. به همین ترتیب، مشخص شده که سورفکتنت زیستی نه تنها می‌تواند پیامدهای سمی مستقیم روی یک یاخته داشته باشد، بلکه می‌تواند حلالیت ترکیب‌های سمی مانند فنانترین را نیز افزایش داده و در نتیجه می‌تواند پیامدهای منفی روی ریزجانداران تجزیه کننده داشته باشد (شاین و همکاران، ۲۰۰۶؛ ون‌هام و همکاران، ۲۰۰۶).

در زیرِ غلظت بحرانی میسلی شدن، انتقال جرم می‌تواند به دلیل کاهش‌های کشش سطحی بین فازهای آلی و آبی و افزایش حلالیت مرتبط با آن، بهبود یابد. همچنین، زدودن LPS با واسطه‌ی سورفکتنت زیستی می‌تواند آب‌گریزی یاخته را افزایش و تجزیه زیستی هیدروکربن را ارتقا دهد، که درمورد رامنولیپید، زیرِ غلظت بحرانی میسل تشریح شده است (التهان و همکاران، ۲۰۰۰).

برای میکروب‌هایی که سطوح یاخته‌ای آب‌گریز را برای چسبیدن مستقیم به فازهای غیرآبی به کار می‌برند، افزودن سورفکتنت زیستی خارجی می‌تواند انتقال جرم را به وسیله برهم‌کنش یاخته-NAPL آب‌گریزکاهش دهد. مثال کلاسیک در این رابطه، حذف *اسینتوباکتر کلکواستیکوس* RAG-1 از قطره‌های هیدروکربن به وسیله امولسان[1] است (رُزن‌برگ، ۱۹۹۳). در اینجا اعتقاد بر این است که یاخته‌های آب‌گریز چسبیده به قطره‌های هیدروکربن یک پوشش امولسان برای نشانه‌دار کردن قطره نفت مصرفی با یک لایه دفعی آب‌دوست آزاد می‌کنند. ژُنگ و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که جذب سطحی، رامنولیپید را روی سطوح یاخته‌ای آب‌گریزی تعدیل می‌کند

1. Emulsan

که وابسته به گونه‌های درگیر، فاز رشدی، و ترکیب و غلظت رامنولیپید است (زیر غلظت بحرانی میسل).

نوردمن و جانسن (۲۰۰۲) نشان دادند که رامنولیپید جذب هگزادکان توسط *سودوموناس آئروجینوزا* UGS را افزایش داده اما در سویه RAG-1 یا دو گونه از *رودوکوکوس* افزایشی دیده نشد. در این مورد نتایج، چسبیدن باکتری به سوبسترای آب‌گریز با واسطه سورفکتنت زیستی را تایید نکرده و نشان داد که ورود سوبسترا با واسطه میسل رخ داده است. افزون بر این در یاخته‌های پرانرژی، جذب ۱- نفتیل‌فنیل آمین[1] که یک کاوشگر فلورسنت آب‌گریز است، توسط رامنولیپید افزایش یافته اما در یاخته‌های بدون انرژی چنین نبود، که نشان از یک سازو کار جذب فعال به کمک سورفکتنت زیستی دارد.

۴-۳-۲- شستشوی خاک

جذب سطحی آلاینده‌های آب‌گریز روی ذرات خاک ممکن است تا حد زیادی دسترسی به سوبسترا برای جذب و سوخت و ساز میکروبی را کاهش دهد. تولید سورفکتنت زیستی توسط برخی از ریزجانداران حلالیت نسبی سوبستراهای کم محلول را افزایش می‌دهد. بنابراین افزودن سورفکتنت‌های زیستی در طول شستشوی خاک مورد بررسی قرار گرفته است.

در طول شستشوی خاک، آلاینده‌ها با فرایند واجذب یا حل شدن به درون محلول شستشو که معمولاً آب است، وارد می‌شوند (لائو و همکاران. ۲۰۰۷). محلول شستشو را می‌توان با یک عامل شستشو دهنده، سورفکتنت‌ها، اسید یا باز، یا عوامل کلات کننده تقویت کرد تا به حذف فلزهای سنگین و آلاینده‌های آلی کمک کند. با توجه به شناخت پیامدهای کم ضررتر سورفکتنت‌های زیستی برای محیط زیست می‌توان آن‌ها را جایگزین سورفکتنت‌های مصنوعی مانند SDS یا توین ۸۰ [2] کرد. درکل، فنّاوری‌های شستشوی خاک می‌توانند به دو فرایند در محل و خارج از محل تقسیم شوند. در فرایندهای در محل، خاک در مکان آلودگی اصلاح می‌شود که هزینه‌ها را کاهش می‌دهد، اگرچه، پالایش کردن به زمان بیشتری نیاز دارد، و نتایج به دلیل تغییرات مکانی همیشه یکنواخت نیست. بر خلاف روش‌های در محل، فرایندهای خارج از محل نیاز به استخراج خاک و انتقال آن قبل از پالایش دارد (کوساریک، ۲۰۰۱).

در رابطه با آلاینده‌های آلی، سانتاآنا و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که خاک شنی آلوده شده با هیدروکربن‌های آروماتیک یا پارافینی می‌تواند با مخلوطی از چهار نوع رامنولیپید تولید شده توسط باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* Pa1 پاک‌سازی شود. کارایی حذف آلاینده‌های آلی از خاک

1. 1-naphthylphenylamine
2. Tween

درآزمایشگاه ۹۱-۷۸ درصد بود. در سایر پژوهش‌ها هم افزایش حذف هیدروکربن با رامنولیپیدها گزارش شده است (بای و همکاران، ۱۹۹۷؛ رحمان و همکاران، ۲۰۰۳؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۷). البته رامنولیپیدهای *سودوموناس آئروجینوزا* UG2 در حذف آفت‌کش‌های تریفلورالین[1]، کومافوس[2] و آترازین از خاک مانند تریتون ایکس[3]-۱۰۰ موثر نبودند (ماتا-سادُوال و همکاران، ۲۰۰۰).

آلودگی محیط با فلزهای سنگین مانند Cd، Pb، Zn، Mg و Cr(III)، مشکل‌ساز است. چراکه فلزهای آزاد شده ممکن است جذب سطحی خاک شوند، در محصولات غذایی تجمع پیدا کنند و معمولاً توسط تصفیه‌ی آب شهری حذف نمی‌شوند (جیووارکار و همکاران، ۲۰۰۷). در خاک‌ها، ته‌نشست‌ها و لجن‌ها، جذب سطحی به عنوان یک فرایند قابل برگشت شروع می‌شود، اما در طول زمان جذب نسبت به واجذب افزایش یافته و قابلیت زیست فراهمی را برای واکنش‌های دگرگونی زیستی محدود می‌کند. یکی از سه روش پالایش برای خاک‌های آلوده شده به فلز، افزون بر جامدسازی [4] و پایداری[5]، شستشوی خاک به همراه سورفکتنت‌های زیستی ویژه است که در پراکندگی، حلالیت و واجذبی کمک می‌کند.

مولیگان و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که سورفاکتین[6] تولید شده به وسیله *باسیلوس سابتیلیس* ATCC 21332، رامنولیپید تولید شده به وسیله *سودوموناس آئروجینوزا* ATCC 9027، و سوفورولیپیدهای[7] حاصل از *تورولوپسیس بومبیکولا* ATCC 22214[8] حذف مس (mg kg^{-1}۱۱۰) و روی (۳۳۰۰ mg kg^{-1}) را از خاک بهبود بخشیدند. رامنولیپید (۰/۵ درصد)، ۶۵ درصد مس و ۱۸ درصد از روی را حذف کرد، در حالی‌که سوفورولیپید ۴ درصد، مقدار ۲۵ درصد از مس و ۶۰ درصد از روی را حذف کرد. تاثیر سورفاکتین (۲ درصد) کم‌تر از محلول‌های شستشوی بدون سورفکتنت بود. ضرایب پایداری برای کمپلکس‌های رامنولیپید- فلز با استفاده از روش رزین تبادل یونی تعیین شدند که نشان داد، مس کمپلکس قوی‌تری از روی ایجاد می‌کند (اوچوآ- لوزا و همکاران، ۲۰۰۱):

$Al^{3+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{3+} > Fe^{3+} > Hg^{3+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > K^{+}$

1. Trifularin
2. Caumpaphos
3. Triton X
4. Solidification
5. Stabilization
6. Surfactin
7. Sophorolipids
8. *Torulopsis bombicola*

دیگر پژوهش‌ها نشـان داده‌اند که رامنولیپیدها سـبب افزایش حذف نیکل و کادمیم از خاک در آزمایشگاه (۱۰۰-۸۰ درصد) و مزرعه (۸۰-۲۰ درصد) (نیلسون و همکاران، ۲۰۰۳)، حذف Cr(III) پایدار از کائولینیت، و حذف Cr(VI) سرطان‌زا (ماسارا و همکاران، ۲۰۰۷) شدند.

۴-۳-۳- تولید سورفکتنت زیستی

سـورفکتنت‌های میکروبی کاربرد گسـترده‌ای در صـنایع نفت، رنگ، مواد غذایی، مواد آرایشـی و کشاورزی، و همچنین در زیست‌پالایی مکان‌های آلوده به فلزهای سنگین و آلی پیدا کرده‌اند. با این حال، برای سـاخت سورفکتنت‌های زیستی در مقیاس وسیع نیاز به کاهش هزینه‌های تولید است تا از نظر اقتصـادی و قدرت رقابتی بیشتر از سورفکتنت‌های مصنوعی مورد توجه قرار گیرند. دو روش ممکن برای تولید در محل و خارج از محل سورفکتنت زیستی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

برای نمونه، هدف تولید سـورفکتنت زیسـتی در محیط‌های طبیعی و در مکان‌های پالایشـی، تحریک رشـد میکروبی به وسـیله ایجاد یک محیط مناسب با تغییر عواملی مانند نوع مواد غذایی و غلظت‌های آن‌ها، مقدار رطوبت و pH اسـت. همچنین تحریک ریزجاندارن بومی یا مایه‌ی تلقیحی ویژه برای تولید سـورفکتنت زیسـتی هم می‌تواند مورد نظر باشـد. تا کنون بهترین نمونه از تولید سـورفکتنت زیسـتی در محل، در عملیات بازیافت تقویت شده‌ی میکروبی نفت[1] (MEOR) گزارش شـده اسـت. به عنوان مثال، سـویه RS-1 *باسـیلوس* و زیرگونه‌ی spizizeni NRRL B-23049 *باسـیلوس سـابتیلیس* به همراه مواد غذایی به درون مخازن نفتی سـنگ آهکی برای تحریک تولید لیپوپپتید تزریق شـدند تا کشـش سطحی بین هیدروکربن و فازهای آبی را پایین آورده و از این راه بازیافت هیدروکربن را افزایش دهند (یوسـف و همکاران، ۲۰۰۷). تولید سـورفکتنت زیستی با روش HPLC تایید و تخمین زده شـد که تولید سـورفکتنت زیستی در محل می‌تواند هزینه‌های بازیافت نفت را تا حدود ۱/۶ دلار در هر بشـکه پایین آورد. بیش از ۴۰۰ تست MEOR در ایالات متحده با کـاربرد ریزجـانداران مانند *زانتوموناس کَمپسـتری*[2]، *باسـیلوس لکینی‌فورمیس*، *سـودوموناس آئروجینوزا* و *دسـولفوویبریو دسـولفوریکَنس*[3] انجام شـده اسـت. با تزریق باکتری‌های تولید کننده سـورفکتنت زیسـتی به چاه‌های نفت، افزایش‌های ۲۰۰-۳۰ درصدی در بازیافت نفت به دست آمده است (سینگ و همکاران، ۲۰۰۷).

بر خلاف تولید در محل، رسـیدن به بازدهی بالا در تولید سـورفکتنت زیستی در شرایط کنترل شده و در راکتورهای زیستی آسان‌تر است. تولید کننده‌های سورفکتنت زیستی تلاش می‌کنند تا با

1. Microbial-enhanced oil recovery
2. *Xanthomonas campestri*
3. *Desulfovibrio desulfuricans*

کاربرد مواد خام ارزان قیمت هزینه‌ها را پایین‌تر بیاورند و با بهینه‌سازی فرمولاسیون محیط کشت، بهره‌گیری از گونه‌های جهش یافته که تولید بیش از حد سورفکتنت زیستی را دارند و استفاده از روش‌های پردازش کارآمد پس از ساخت، بازدهی را افزایش دهند و با سورفکتنت‌های مصنوعی رقابت کنند. روغن‌هایی مانند آفتاب گردان، سویا، هسته انگور، ذرت ترکی، خرما و همچنین ضایعات روغن‌های سرخ‌کردنی و ضایعات تصفیه‌خانه روغن می‌توانند به عنوان سوبستراها استفاده شوند. آب پنیر، ضایعات کارخانه یا محل تقطیر، پساب ته‌نشین شده از فرایند آماده‌سازی سیب‌زمینی، پسماند آرد نشاسته کاساوا[1] نیز برای تولید سورفکتنت زیستی آزمایش شده‌اند. کاربرد این مواد پتانسیل کاهش هزینه‌های تولید به مقدار حدود ۳۰-۱۰ درصد را دارد (موکرجی و همکاران، ۲۰۰۶). کوساریک (۱۹۹۲) برای دستیابی به محصول‌های با ارزش افزوده از ضایعات، با استفاده از لجن فاضلاب زباله‌های شهری آلوده به آلاینده‌های آلی به عنوان سوبسترا برای رشد بی‌هوازی *تورولوپسیس بومبیکولا*، لیپید سوفوروس[2] تولید کردند.

فرایندهای بهینه‌سازی، سطح و نسبت‌های عناصر کلیدی مانند کربن، آهن، نیتروژن، فسفر و منگنز را مورد توجه قرار می‌دهد. به عنوان مثال، در نسبت‌های بالای C/N، تولید سورفکتنت زیستی به وسیله *سودوموناس آئروجینوزا* افزایش یافت، در حالی‌که افزایش غلظت‌های کاتیون دو ظرفیتی یک اثر محدود کننده داشت (سُبرون- چاوز و همکاران، ۲۰۰۵). فشار اکسیژن، pH، دما هم بسیار مهم هستند و برای بهینه‌سازی همه‌ی عوامل می‌توان از روش بهینه‌سازی آماری بر اساس روش سطح پاسخ[3] (RSM) استفاده کرد. روش سطح پاسخ یک روش طرح سه فاکتوره‌ی آماری است که بین یک یا چند پاسخ وابسته اندازه‌گیری شده و بین چند فاکتور ورودی (غیروابسته) ارتباط برقرار می‌کند (پوپا و همکاران، ۲۰۰۷). از این روش در بهینه‌سازی تولید سورفکتنت زیستی توسط *سودوموناس آئروجینوزا* EM1 (وو و همکاران، ۲۰۰۸)، *باسیلوس سابتیلیس* (سن و اسوامیناتان، ۲۰۰۴)، *لاکتوباسیلوس لاکتیس*[4] 53 و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[5] A (رُدریگز و همکاران، ۲۰۰۶b) به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است.

آرایش ژنتیکی سویه تولید کننده روی بازدهی سورفکتنت زیستی اثرگذار بوده و در کاربردهای صنعتی اهمیت دارد. آگاهی از ژن‌های ساختاری و تنظیم کننده سورفکتنت‌های زیستی و همچنین ساز و کار ترشح آن‌ها بسیار ارزشمند هستند که بایستی کسب شوند و این اطلاعات می‌توانند تغییرات ژنتیکی را جهت‌دهی کنند. از باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا* و *باسیلوس سابتیلیس*

1. Cassava flour
2. Sophorose
3. Response surface methodology
4. *Lactococcus lactis*
5. *thermophilus*

بیشتر به دلیل اینکه ژنتیک آن‌ها به خوبی شناخته شده است، استفاده می‌شود (سالیوان، ۱۹۹۸). به عنوان مثال، وانگ و همکاران (۲۰۰۷) گونه‌های مهندسی ژنتیکی شده *سودوموناس آئروجینوزا* PEER02 و *ایشریشیا کولای*[1] TnERAB را، که قادر به تولید رامنولیپیدهایی از سوبستراهای ارزان قیمت با کارایی بالا بودند گزارش کردند. سپس رامنولیپیدهای تولید شده در آزمایش‌های جابه‌جایی نفت مورد استفاده قرار گرفتند، که مقادیر بالایی از بازیافت نفت را از یک توده شنی نشان دادند.

فرایندهای پس از ساخت ممکن است بیش از ۶۰ درصد کل هزینه‌های تولید سورفکتنت زیستی را شامل شود و ته‌نشینی به روش کلاسیک، استخراج حلال یا سانتریفوژ به وفور با فنّاوری‌های جدید مانند اولترا فیلتراسیون، جزءبندی فوم، کروماتوگرافی تبادلی یا جذب- واجذب روی رزین‌های پلی‌استایرن[2] استفاده می‌شوند (موکرجی و همکاران، ۲۰۰۶).

۴-۴- نتیجه‌گیری

سورفکتنت‌های زیستی گستره‌ای از نقش‌های مهم را در چرخه‌های زندگی میکروبی بازی می‌کنند و همچنین توانایی بالقوه‌ای برای کاربرد در فنّاوری‌های مختلف صنعتی، پزشکی و زیست محیطی دارند. توانایی سورفکتنت‌های زیستی برای کاهش کشش و برهم‌کنش‌های سطحی و افزایش حلالیت نسبی آلاینده‌های آلی آب‌گریز و همچنین فلزها، فرصتی عالی را برای کاربرد آن‌ها در زیست‌پالایی ایجاد می‌کند. هر دو روش تولید در محل و خارج از محل سورفکتنت زیستی و زیست‌پالایی از پژوهش‌های متداول درباره‌ی مبانی مولکولی، زیست شیمیایی و فیزیولوژی سوخت و ساز سورفکتنت‌های زیستی بهره خواهند گرفت. با پیشرفت روش‌های تولید، بایستی هزینه‌های تولید سورفکتنت زیستی کاهش یابد و کاربرد آن‌ها به عنوان فراورده‌ی طبیعی در پالایش زیست محیطی گسترده‌تر شود.

---

1. *Escherichia coli*
2. Polystyrene resins

منابع

Al-Tahhan RA, Sandrin TR, Bodour AA, Maier RM (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl Environ Microbiol 66:3262–3268.

Amézcua-Vega C, Poggi-Varaldo HM, Esparza-Garcia F, Rios-Leal E, Rodriguez-Vazquez R (2007) Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by Candida ingens and changes of surface tension of culture media. Biores Technol 98:237–240.

Bai G, Brusseau ML, Miller RM (1997) Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. J Contam Hydrol 25:157–170

Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. J Bacteriol 189:6312–6323.

Bodour AA, Dress KP, Maier RM (2003) Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl Environ Microbiol 69:3280–3287.

Brown DG (2007) Relationship between micellar and hemi-micellar processes and the bioavailability of surfactant-solubilized hydrophobic organic compounds. Environ Sci Technol 41:1194–1199.

Berti AD, Gieue NJ, Christenser QH, Thomas MG (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swaming motility & Pseudoronas Syrigae PV. to natio DC3000. J Bacterial 189:6312–6323.

Calfee MW, Shelton JG, McCubrey JA, Pesci EC (2005) Solubility and bioactivity of the Pseudomonas quinolone signal are increased by a Pseudomonas aeruginosa-produced surfactant. Infect Immun 73:878–882.

Das K, Mukherjee AK (2007) Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. J Appl Microbiol 102:195–203.

Debode J, De Maeyer K, Perneel M, Pannecoucque J, De Backer G, Hofte M (2007) Biosurfactants are involved in the biological control of

Verticillium microsclerotia by Pseudomonas spp. J Appl Microbiol 103:1184–1196.

Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev 61:47–64

Fukuoka T, Morita T, Konishi M, Imura T, Kitamoto D (2007) Characterization of new glycolipid biosurfactants, tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by Pseudozyma yeasts. Biotechnol Lett 29:1111–1118.

Gutiérrez T, Mulloy B, Bavington C, Black K, Green DH (2007) Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium Antarctobacter. Appl Microbiol Biotechnol 76:1017–1026.

Hickey AM, Gordon L, Dobson ADW, Kelly CT, Doyle EM (2007) Effect of surfactants on fluoranthene degradation by Pseudomonas alcaligenes PA-10. Appl Microbiol Biotechnol 74:851–856.

Juwarkar AA, Nair A, Dubey KV, Singh SK, Devotta S (2007) Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere 68:1996–2002.

Kaya K, Morrison LF, Codd GA (2006) A novel biosurfactant, 2-acyloxyethylphosphonate, isolated from waterblooms of Aphanizomenon flos-aque. Molecules 11:539–548.

Kosaric N (1992) Biosurfactants in industry. Pure Appl Chem 64:1731–1737.

Kosaric N (2001) Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol Biotechnol 39:295–304.

Lao LU, Chen A, Mutsumoto MR, Mulchandani A, Chen W (2007) Cadmium removal from contaminated soil by thermally responsive elastin (ELPEC20) biopolymers. Biotechnol Bioeng 98:349–355.

Leclère V, Marti R, Bechet M, Fickers P, Jacques P (2006) The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of Bacillus subtilis strains by their surface-active properties. Arch Microbiol 186:475–483.

Lee SC, Kim SH, Park IH, Chung SY, Choi YL (2007) Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from Bacillus amyloliquefaciens LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. Arch Microbiol 188:307–312.

Makkar RS, Cameotra S (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl Microbial Biotechnol 58:428–434.

Maneerat S, Bamba T, Harada K, Kobayashi A, Yamada H, Kawai F (2006) A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, Myroides sp strain SM1. Appl Microbiol Biotechnol 70:254–259.

Massara H, Mulligan CN, Hadjinicolaou J (2007) Effect of rhamnolipids on chromium-contaminated kaolinate. Soil Sedim Contam 16:1–14

Mata-Sadoval J, Karns J, Torrents A (2000) Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. Environ Sci Technol 36:4669–4675.

Miller RM, Bartha R (1989) Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. Appl Environ Microbiol 55:269–274.

Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T (2000) A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids 1488:211–218.

Morita T, Konishi M, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto D. (2006) Discovery of Pseudozyma rugulosa NBRC 10877 as a novel producer of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, based on rDNA sequence. Appl Microbiol Biotechnol 73:305–313.

Mukherjee S, Das P, Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol 24:509–515.

Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut 133:183–198.

Mulligan CN, Youn RN, Gibbs B (2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. J Hazard Mater 85:111–125.

Neilson JW, Artiola JF, Maier RM (2003) Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. J Environ Qual 32:899–908.

Noordman WH, Janssen DB (2002) Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol 68:4502–4508.

Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. J Environ Oual 30:479–485.

Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 189:2531–2539.

Parales RE, Harwood CS (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. Curr Opin Microbiol 5:266–273

Peng F, Liu Z, Wang L, Shao Z (2006) An oil-degradation bacterium: Rhodococcus erythropolis strain 3C-9 and its biosurfactants. J Appl Microbiol 102:1603–1611.

Perfumo A, Banat IM, Canganella F, Marchant R (2006) Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading Pseudomonas aeruginosa AP02-1. Appl Microbiol Biotechnol 72:132–138.

Popa O, Babeanu N, Vamanu A, Vamanu E (2007) The utilization of the response surface methodology for the optimization of cultivation medium and growth parameters in the cultivation of the yeast strain S. cerevisiae 3.20 on ethanol. Afr J Biotechnol 6:2700–2707.

Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Biores Technol 90:159–168.

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006a) Biosurfactants: potential applications in medicine. J Antimicrob Chemother 57:609–618.

Rodrigues LR, Teixeira JA, Oliveira R (2006b) Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. Biochem Eng J 32:135–142.

Rosenberg E (1993) Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. Trends Biotechnol 11:419–424

Sabirova JS, Ferrer M, Regenhardt D, Timmis KN, Golyshin PN (2006) Proteomic insights into metabolic adaptations in Alcanivorax borkumensis induced by alkane utilization. J Bacteriol 188:3763–3773.

Santa Anna LM, Soriano AU, Gomes AC, Menezes EP, Gutarra LEM, Freire MGD, Pereira Jr N (2007) Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. J Chem Technol Biotechnol 82:687–691.

Schneiker S, dos Santos VAPM, Bartels D, Bekel T, Brecht M, Buhrmester J, Chernikova TN, Denaro R, Ferrer M, Gertler C, Goesmann A, Golyshina OV, Kaminski F, Khachane AN, Lang S, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Nechitaylo T, Puhler A, Regenhardt D, Rupp O, Sabirova JS, Selbitschka W, Yakimov MM, Timmis KN, Vorholter FJ, Weidner S, Kaiser O, Golyshin

PN (2006) Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium Alcanivorax borkumensis. Nat Biotechnol 24:997–1004.

Sen R, Swaminathan T (2004) Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. Biochem Eng J 21:141–148.

Shin KH, Kim KW, Ahn Y (2006) Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization–biodegradation process. J Hazard Mater 137:1831–1837.

Singh A, Van Hamme JD, Ward O (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnol Adv 25:99–121.

Soberón-Chávez G, Lepine F, Deziel E (2005) Production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa. Appl Micobiol Biotechnol 68:718–725.

Sokolovská I, Rozenberg R, Riez C, Rouxhet PG, Agathos SN, Wattiau P (2003) Carbon sourceinduced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of Rhodococcus erythropolis E1. Appl Environ Microbiol 69:7019–7027.

Soltani M, Metzger P, Largeau C. (2004) Effects of hydrocarbon structure on fatty acid, fatty alcohol, and beta-hydroxy acid composition in the hydrocarbon-degrading bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus. Lipids 39:491–505.

Straight PD, Willey JM, Kolter R. (2006) Interactions between Streptomyces coelicolor and Bacillus subtilis: Role of surfactants in raising aerial structures. J Bacteriol 188:4918–4925.

Sullivan ER (1998) Molecular genetics of biosurfactant production. Curr Opin Biotechnol 9:263–269.

Taguchi F, Ogawa Y, Takeuchi K, Suzuki T, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2006) A homologue of the 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III gene located in the glycosylation island of Pseudomonas syringae pv. tabaci regulates virulence factors via N-acyl homoserine lactone and fatty acid synthesis. J Bacteriol 188: 8376–8384.

Teichmann B, Linne U, Hewald S, Marahiel MA, Bolker M (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from Ustilago maydis. Mol Microbiol 66:525–533.

Tremblay J, Richardson AP, Lepine F, Deziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the Pseudomonas aeruginosa swarming motility behaviour. Environ Microbiol 9:2622–2630.

Tsuge K, Ohata Y, Shoda M (2001) Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in Bacillus subtilis. Antimicrob Agents Chemother 45:3566–3573.

Van Hamme JD (2004) Bioavailability and biodegradation of organic pollutants: a microbial perspective. In: Singh A, Ward OP (ed) Bioremediation, phytoremediation and natural attenuation. Springer, Heidelberg, pp 37–56.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 67: 503–549.

Van Hamme JD, Singh A, Ward OP (2006) Physiological aspects — Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol Adv 24: 604–620.

Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard III WA, Tang Y (2007) Engineering bacteria from production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol Bioeng 98(4):842–853

Wessels JGH (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. Adv Microb Physiol 38: 1–45.

Whang LM, Liu PWG, Ma CC, Cheng SS (2007) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfaction, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. J Hazard Mater 151:155–163.

Willey JM, van der Donk WA (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. Annu Rev Microbiol 61:477–501.

Wu JY, Yeh KL, Lu WB, Lin CL, Chang JS (2008) Rhamnolipid production with indigenous Pseudomonas aeruginosa EM1 isolated from oil-contaminated site. Biores Technol 99:1157–1164.

Youssef N, Simpson DR, Duncan KE, McInerney MJ, Folmsbee M, Fincher T, Knapp RM (2007) In situ biosurfactant production by Bacillus strains injected into a limestone petroleum reservoir. Appl Environ Microbiol 73:1239–1247.

Zhong H, Zeng GM, Yuan XZ, Fu HY, Huang GH, Ren FY (2007) Adsorption of dirhamnolipid on four microorganisms and the effect on cell surface hydrophobicity. Appl Microbiol Biotechnol 77:447–445.

Zoubalis AI, Matis KA, Lazaridis NK, Golyshin PN (2003) The use of biosurfactants in Flotation: application for the removal of metal ions. Minerals Eng 16:1251–1236.

فصل پنجم

تنوع منواکسیژناژهای دی–آهن محلول[1]
با کاربردهای زیست‌پالایی

Andrew J. Holmes

1. Soluble Di-iron Monooxygenases

۵-۱- مقدمه

آلودگی با ترکیب‌های آلی (به ویژه ترکیب‌های زیست‌بیگانه) مشکل عمده در جوامع صنعتی است. تیمار فاضلاب به منظور حذف آلاینده‌های احتمالی یا پالایش مکان‌های آلوده را می‌توان با بهره‌برداری از گنجایش تجزیه‌کنندگی باکتری‌ها به انجام رساند. اکسیژناژها از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های استفاده شده به وسیله باکتری‌ها در تجزیه ترکیب‌های آلی هستند. این آنزیم‌ها افزودن اتم‌های اکسیژن به ترکیب‌های آلی برای تولید الکل، اپوکسید و غیره را تسریع می‌کنند به طوری‌که واکنش‌پذیری بیشتر آن‌ها (الکل و اپوکسید) سبب می‌شود که به سوبستراهایی برای طیف گسترده‌تری از آنزیم‌ها تبدیل شوند (ارلاکر و اشمید، ۲۰۰۶). محدوده سوبسترای سازگار با اکسیژنازهای شناخته شده بسیار گسترده است و مسیرهای تجزیه تعداد زیادی از آلاینده‌های آلی با اکسیژنازها آغاز می‌شود. این سبب می‌شود که این آنزیم‌ها به عنوان آنزیم‌های مهم بنیادی در بسیاری از پروژه‌های زیست‌پالایی باشند. آن‌ها تعدادی از خانواده‌های پروتئینی مختلف با ساختارهای شیمیایی مجزا را شامل می‌شوند (پارک، ۲۰۰۷؛ ارلاکر و ایبن، ۲۰۰۶؛ ون‌بیلن و فان‌هوف، ۲۰۰۵؛ ون‌برکل و همکاران، ۲۰۰۶؛ وَکت، ۲۰۰۲).

این فصل روی خانواده‌ای از منواکسیژنازها تمرکز می‌کند که منواکسیژنازهای دی- آهن محلول (SDIMO) نام‌گذاری شده‌اند. همچنین به آن‌ها منواکسیژنازهای چند جزیی باکتریایی[1] (BMM) هم گفته می‌شود که کاربردهای گسترده‌ای در زیست‌پالایی دارند (لیهی و همکاران، ۲۰۰۳؛ نوتومیستا و همکاران، ۲۰۰۳). پیشرفت‌های اخیر در شناخت تنوع منواکسیژنازهای دی- آهن محلول فرصت‌های جدیدی برای استفاده مفید از آن‌ها در زیست‌پالایی ایجاد می‌کند.

۵-۲-منواکسیژنازهای دی- آهن محلول (SDIMO ها)

۵-۲-۱-بیوشیمی

منواکسیژنازهای دی- آهن محلول آنزیم‌های چند جزیی هستند که در باکتری‌ها و آرکی‌ها یافت می‌شوند (نوتومیستا و همکاران، ۲۰۰۳) و معمولاً از سه جزء تشکیل شده‌اند: زیر واحد چندتایی پروتئین H (هیدروکسیلاز)، پروتئین R (ریداکتاز) و پروتئین B (که متفاوت از پروتئین B مونواکسیژناز متان محلول است). جایگاه فعال قرارگیری اکسیژن در درون زیرواحد آلفای پروتئین H است و یک مرکز دی- آهن غِیرهم (متصل شده به کربوکسیلات) دارد. منواکسیژنازهای دی-

1. Bacterial multicomponent monooxygenases

آهن محلول می‌توانند طیف وسیعی از واکنش‌های شیمیایی شامل هیدروکسیلاسیون[1]، دی‌هیدروکسیلاسیون[2] و اپوکسیداسیون[3] هیدروکربن‌ها را انجام دهند (وَکت، ۲۰۰۲). گستره سوبسترا در تمامی نمونه‌های مشخص شده بسیار وسیع است و در یک خانواده از آلکان‌های کوچک مانند متان تا ترکیب‌های پیچیده دارای استخلاف حلقوی را شامل می‌شود (کالبی و همکاران، ۱۹۷۷). توجه به این مسئله مهم است که در حالی‌که تمامی منواکسیژنازهای دی- آهن محلول طیف گسترده‌ای از سوبسترا را دارند اما باهم تداخل ندارند و منواکسیژنازهای دی- آهن محلول متفاوت می‌توانند تفاوت‌های سینتیکی قابل‌توجهی را نشان دهند. در نتیجه، آنزیم‌های متفاوت کاربردهای مختلفی دارند (وَکت، ۲۰۰۲؛ واتاناب و همکاران، ۲۰۰۲).

۵-۲-۲-نقش‌های فیزیولوژیکی

نقش فیزیولوژیکی تمامی منواکسیژنازهای دی- آهن محلول شناخته شده، تجزیه هوازی ترکیب‌های آلی است. به طور تجربی ثابت شده که این آنزیم‌ها در مرحله اول استفاده از متان، اتیلن، پروپان، پروپن، بوتان، تتراهیدروفوران، فنول، بنزن و تولوئن نقش دارند. با وجود طیف گسترده سوبسترا برای تمامی منواکسیژنازهای دی- آهن محلول، ظاهراً آنزیم‌های مختلف نقش‌های فیزیولوژیکی محدودی دارند و اغلب تنها در حضور سوبسترای فیزیولوژیکی بیان می‌شوند. این امر پیامدهایی برای بهره‌برداری از آن‌ها در زیست‌پالایی دارد، چراکه غنی‌سازی انتخابی محیط باکتری‌های بیان کننده این آنزیم‌ها با نقش‌های فیزیولوژیکی محدود نسبتاً آسان است. منواکسیژنازهای دی- آهن محلول به عنوان بهترین آنزیم‌های فرعی (کمکی) با استثناهایی در مورد برخی از متانوتروف‌ها مطرح شده‌اند (دِدیش و همکاران، ۲۰۰۵؛ تایسن و همکاران، ۲۰۰۵). اکثریت قریب به اتفاق جانداران دارای منواکسیژنازهای دی- آهن محلول هتروتروف‌های اختیاری هستند که قادر به رشد روی طیف وسیعی از سوبستراها هستند. منواکسیژنازهای دی- آهن محلول در هر جا که باشند، دارای ژن‌های ضروری نیستند و تنها در یک طیف متوسط از سوبسترای رشد بیان می‌شوند. در متانوتروف‌ها ماجرا فرق می‌کند. چراکه بیشتر متانوتروف‌های شناخته شده متانوتروف‌های اجباری هستند. حتی در این‌جا هم متان منواکسیژنازها[4] (MMO ها) (گروه سوم منواکسیژنازهای دی- آهن محلول) می‌توانند به عنوان یک آنزیم فرعی مورد توجه قرار گیرند، زیرا

1. Hydroxylation
2. Dihydroxylation
3. Epoxidation
4. Methane monooxygenase

ظاهراً یک متان مونواکسیژناز دیگر (متان منواکسیژناز ذره‌ای ناهمسان[1]) آنزیم مهم‌تری در یاخته است (دومونت و مورل، ۲۰۰۵).

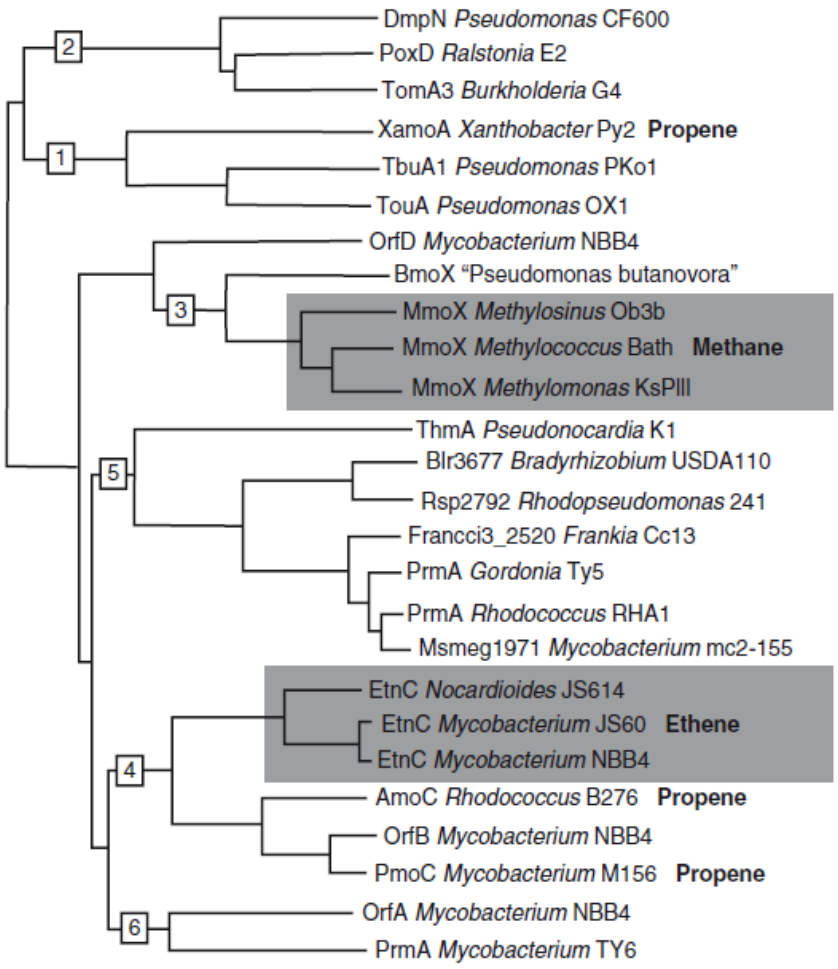
۵-۲-۳-ژنتیک، تنوع و طبقه‌بندی

در حال حاضر مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول شناخته شده یک گروه متنوع و مجزا هستند که به آسانی به وسیله روابط توالی ژن‌هایشان شناسایی می‌شوند. پروتئین‌ها در یک اُپرون منفرد ۶-۴ ژنی رمز می‌شوند. اگر تنها آن آنزیم‌هایی را بررسی کنیم که اطلاعات توالی اُپرون آن‌ها به طور کامل در دسترس است، حداقل شش گروه به راحتی متمایز می‌شوند (کولمن و همکاران، ۲۰۰۶؛ لیهی و همکاران، ۲۰۰۳؛ نوتومیستا و همکاران، ۲۰۰۳). در آنالیز فیلوژنتیکی، هر کدام از این گروه‌ها به خوبی از دیگر گروه‌ها جدا شده‌اند و همچنین یک آرایش اُپرون مشخص را به اشتراک می‌گذارند که طبقه‌بندی مبتنی بر فیلوژنتیک را بیشتر تایید می‌کند (شکل۵-۱). ساختمان چهارم آنزیم‌ها نیز با این طرح سازگار است، تا آن‌جا که منواکسیژنازهای دی- آهن محلول از زیرگروه مشابه، شکل یکسانی دارند. در مورد گروه‌های ۱، ۲، و ۳ سه زیرواحد پروتئین H در آرایش $\alpha2\beta2\gamma2$ وجود دارد، و گروه‌های ۴، ۵ و ۶ ظاهراً بدون زیرواحد گاما هستند و آرایش $\alpha2\beta2$ را دارند. با وجود همبستگی کامل بین روابط فیلوژنتیکی و ساختار اُپرون، این مسئله اجتناب‌ناپذیر است که با بزرگ شدن پایگاه‌های اطلاعاتی تمایز بین گروه‌ها در برخی موارد کاهش می‌یابد. در حال حاضر یک نمونه منواکسیژناز دی- آهن محلول با عملکرد ناشناخته وجود دارد که از نظر فیلوژنتیکی خویشاوند منواکسیژنازهای دی- آهن محلول گروه ۳ است، اما ساختار اُپرون متمایزی دارد (هولمز و کُلمن، ۲۰۰۸). این احتمال نیز وجود دارد که گروه‌های بیشتری نیز شناخته شوند. بررسی‌ها مبتنی بر PCR ژن‌های زیر واحد آلفا تنوع بالایی از منواکسیژنازهای دی- آهن محلول را نشان داده‌اند، که بسیاری از آن‌ها به روشنی در یکی از شش زیر گروه موجود طبقه‌بندی نمی‌شوند (کُلمن و همکاران، ۲۰۰۶). به نظر می‌رسد که آنزیم‌های خویشاوند نقش‌های فیزیولوژیکی مشابهی را به اشتراک می‌گذارند. به عنوان مثال، تمامی منواکسیژنازهای متان محلول دارای یک زیرگروه مشابه در گروه ۳ هستند (sMMO ها)، و هر کدام از منواکسیژنازهای اِتن و پروپن دارای زیرگروه‌های مشابه در گروه ۴ هستند (شکل ۵-۱). همچنین به نظر می‌رسد که ارتباطی کلی بین زیر گروه‌های منواکسیژناز دی- آهن محلول با خویشاوندی دورتر و نقش‌های فیزیولوژیکی متمایز وجود دارد. گروه ۱ و ۲ منواکسیژنازهای دی- آهن محلول از نظر فیلوژنی از سایر خانواده متمایز هستند و عمدتاً در تجزیه سوبستراهای معطر (آروماتیک) درگیر هستند (aro-SDIMO ها). تقریباً همه گروه‌های ۳، ۴، ۵، و ۶ منواکسیژنازهای دی- آهن محلول، آلکان‌ها یا آلکن‌های کوتاه زنجیره

1. Heterologous particulate methane monooxygenase

را هدف قرار می‌دهند (alk-SDIMO ها). مورد استثنای قابل‌توجه، گروه ۱ مونواکسیژناز دی- آهن محلول باکتری *زانتوباکتر* Py2 است که یک مونواکسیژناز آلکن است (چامپردا و همکاران، ۲۰۰۴). با گسترش پایگاه‌های اطلاعاتی، این احتمال وجود دارد که استثناهای بیشتری از مونواکسیژناز دی- آهن محلول که ترکیب‌های آروماتیک را هدف قرار می‌دهند (در مقایسه با آلکن/آلکان) پدیدار شود.

به نظر می‌رسد سیستم طبقه‌بندی مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول بسیار قوی است و حداقل دارای قدرت پیش‌بینی مفید است. تمایل مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول به استقرار روی عناصر متحرک و انتقال افقی توسط آن‌ها به این معنی است که گنجایشی بسیار محدود برای پیشگویی هویت باکتری میزبان از روابط توالی مونواکسیژناز دی- آهن محلول وجود دارد. به هر روی، همبستگی کافی بین طبقه‌بندی مونواکسیژناز دی- آهن محلول و نقش‌های فیزیولوژیکی آنزیم‌ها در جاندار میزبان وجود دارد که ممکن است در پیش‌بینی توالی‌های خویشاوند نزدیک از سوبسترای فیزیولوژیکی ایجاد شده باشد. با این وجود، بایستی آگاه باشیم که مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول شناسایی شده بیانگر تنوعی که در طبیعت وجود دارد، نیست و مشخص است که برخی سویه‌ها دارای مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول متفاوت چندگانه هستند (کُلمن و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، دیدگاه ما از محدوده فیزیولوژی مرتبط با مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول شدیداً دارای اُریبی بالقوه بوده و بایستی در درک نقش فیزیولوژیکی آنزیم‌ها جوانب احتیاط اعمال شود.



شکل ۵-۱ روابط تکاملی SDIMO ها. شاخه‌های تکاملی منجر به ایجاد شش گروه روی دندروگرام نشان داده شده است. در هر مورد، همه اعضای شناخته شده‌ی گروه ساختار اُپرون یکسانی را به اشتراک می‌گذارند. توجه شود که OrfD از سویه NBB4 *مایکوباکتریوم* از نظر فیلوژنتیکی متعلق به گروه سوم SDIMO ها است اما بخشی از یک اُپرون مجزا است. زیرگروه‌هایی که در آن تمامی اعضا نقش فیزیولوژیکی مشابهی را به اشتراک می‌گذارند با سایه مشخص شده‌اند. جزئیات بیشتر درباره‌ی aro-SDIMO ها (گروه ۱ و ۲)، و sMMO ها (گروه ۳)، و alk-SDIMO ها (گروه ۴، ۵، و ۶) در کُلمن و همکاران (۲۰۰۶)، آیوی و همکاران (۲۰۰۷) و مَک‌دونالد و همکاران (۲۰۰۶) آورده شده است.

۵-۳-کاربردهای مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول در زیست‌پالایی: آلاینده‌ها و رویکردها

پیوستگی بین نقش فیزیولوژیکی محدود و دسترسی به سوبستراهای گسترده دو روش متمایز کاربرد برای جانداران دارای مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول در زیست‌فناوری محیط زیست ایجاد می‌کند: روش اول مبتنی بر متابولیسم مرتبط با رشد[1] است که به نقش فیزیولوژیکی توجه دارد و روش دوم مبتنی بر کومتابولیسم[2] است که به دسترسی به سوبستراهای مختلف توجه دارد.

۵-۳-۱-متابولیسم مرتبط با رشد

اگر سوبسترایی مورد حمله موجودی قرار گیرد و تنها در راستای رشد آن تجزیه شود، به این فرایند، تجزیه مرتبط با رشد گفته می‌شود. مزایای رشد مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول ناشی از متابولیسم فرآورده‌های واکنش است. زیرا مرحله کاتالیز شده با مونواکسیژناز دی- آهن محلول انرژی‌گیر است. SDIMOها معمولاً می‌توانند ترکیب را بیشتر تجزیه کرده و از آن به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده کنند. ترکیب‌های آروماتیک می‌توانند بخش‌های قابل توجهی از فاضلاب‌های صنعتی باشند و اغلب از آلاینده‌های زیست محیطی هستند. جداسازی جانداران متنوع از نظر بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی که قادر به رشد روی سوبستراهای آروماتیک هستند گزارش شده است. مونواکسیژنازهای دی-آهن محلول- آروماتیک (aro-SDIMO ها) شامل تعدادی از آنزیم‌های بسیار کارآمد برای کاتالیز این سوبستراها هستند، و جاندارانی که این آنزیم‌ها را بیان می‌کنند، بارها دیده شده‌اند. شاید بهترین مورد آن تجزیه کنندگان فنل باشند. در راکتورهای زیستی که ممکن است غلظت فنل به وسیله فعالیت میکروبی در سطوح نسبتاً پایین نگه داشته شوند، جاندارانی با Ks پایین (میل ترکیبی بالا) تمایل به غالب شدن دارند. در پژوهش‌های متعددی مشخص شده است که این جانداران فنل هیدروکسیلازهای چند بخشی را بیان می‌کنند (گروه ۲ مونواکسیژنازهای دی- آهن محلول) (باسیل و اریمان، ۲۰۰۸؛ فوتاماتا و همکاران، ۲۰۰۱؛ واتاناب و همکاران، ۱۹۹۸). متابولیسم مرتبط با رشد جاندارانی که SDIMOهای گروه ۱ یا گروه ۲ را به صورت بالفعل یا بالقوه بیان کنند در تجزیه تعداد زیادی از ترکیب‌های آروماتیک شامل فنل، بنزن و تولوئن کاربرد پیدا کرده‌اند.

شایسته تاکید است که زمینه متابولیک بیانِ SDIMO (یعنی بودن مرحله پایین‌دست مناسب در مسیر تجزیه) است که تعیین می‌کند فعالیت این آنزیم برای یاخته سودی دارد یا نه. تعداد زیادی از SDIMOهای گروه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ نیز می‌توانند به ترکیب‌های آروماتیک حمله کنند، اما جاندارانی که این آنزیم‌ها را در اختیار دارند معمولاً فاقد ژن‌های اضافی لازم برای بهره‌برداری از

1. Growth-linked metabolism
2. Cometabolism

این ترکیب‌ها در رشـد هسـتند. شـاید بهترین مثال از این مورد، تجزیه اِتن‌های کلردار[1] باشـد. در تعدادی از سـویه‌های بیان کننده SDIMO از گروه ۴، اسـتفاده از وینیل کلرید[2] در شـرایط هوازی گزارش شده است (کُلمن و همکاران، ۲۰۰۲). اگرچه، تمامی گونه‌های بیان کننده این آنزیم قادر به رشد روی وینیل کلرید نیستند. آنزیم کلیدی در این مورد اِتن مونواکسیژناز است و تنها در جایی‌که یک اپوکسـی‌آلکان (ترانسـفراز کوانزیم M) نیز وجود داشته باشد یاخته‌ها می‌توانند روی VC رشد کنند (کُلمن و اسـپین، ۲۰۰۳a). تمامی تجزیه کنندگان اِتن قادر به تجزیه VC هستند، اما تنها در مواردی که آنزیم مازاد هم به محیط اضـافه شـود، تجزیه مرتبط با رشـد اسـت. در غیر این صورت، تجزیه VC از طریق کومتابولیسم اتفاق می‌افتد.

۵-۳-۲-کومتابولیسم

در کومتابولیسـم هیچ سودی برای یاخته انجام دهنده واکنش وجود ندارد، و حتی ممکن است رشد از طریق بازدارنده رقابتی برای سوبسترا به تاخیر افتد. با این وجود، برای تعداد زیادی از آلاینده‌هایی که به سختی تجزیه می‌شوند، این مورد (کومتابولیسم) یک گزینه مفید برای شروع تجزیه به وسیله دیگر فرایندها اسـت. بسـیاری از اکسیژنازها کاتالیست‌های بسیار قدرتمندی هستند که قادر به قرار دادن اتم‌های اکسـیژن در درون ترکیب‌های پایدار شـیمیایی هسـتند. هیدروکسـیلاسـیون (یا اپوکسـیداسـیون) سـوبسترا سبب سمیت کمتر آن شده و آن را برای تجزیه بیشتر مناسب می‌کند. مونواکسـیژنازهای دی- آهن محلول مثال‌های خوبی هسـتند و محدوده‌ی گسترده سوبسترای آن‌ها سـبب می‌شـود که بتوانند اتم‌های اکسـیژن را در درون طیف وسـیعی از ترکیب‌های آلی جاسـازی نمـایند. جالب این‌که آلاینده‌های نوظهور و دارای ارجحیت مانند اِتن‌های کلردار، متیل ترت- بوتیل اتر[3] (MTBE)، اِن- نیتروسـدی‌متیل آمین[4] (NDMA) و دی‌اُکسان[5] هم جزء این ترکیب‌های آلی هسـتند. هر دو گروه alk و aro از مونواکسـیژنازهای دی- آهن محلول پتانسیل کاربرد در برخی یا تمـامی این ترکیـب‌ها را دارند (فوتاماتا و همکاران، ۲۰۰۵؛ هاس و همکاران، ۲۰۰۶؛ لی و همکاران، ۲۰۰۶؛ ماهندرا و همکاران، ۲۰۰۷؛ متس و همکاران، ۲۰۰۵؛ شارپ و همکاران، ۲۰۰۷). بهره‌برداری موفق از کومتابولیسـم برای زیست‌پالایی نیازمند مدیریت دقیق‌تر این فرایند است. این مورد به ویژه در جانداران اسـتفاده کننده از SDIMOها که در آن آنزیم‌ها معمولا به طور سازنده بیان نمی‌شوند و فرم‌های مختلف آن‌ها توانایی متفاوت برای تجزیه سوبسترا را دارند، بسیار مهم‌تر است. راه‌کارهایی

1. Chlorinated ethenes
2. Vinyl chloride
3. Methyl *tert*-butyl ether
4. *N*-nitrosodimethylamine
5. Dioxane

برای حصـــول اطمینـان از این‌که یاخته‌ها آنزیم‌های مورد نظر را بیان می‌کنند و همچنین آنزیم‌ها فعالیت پایدار دارند، ضروری است.

برای نمونه، تعیین ویژگی سویه‌های مدل آزمایشگاهی به این مورد اشاره می‌کند که SMMOها (SDIMO های گروه ۳) مناسـب‌ترین ویژگی‌های سینتیکی را برای تجزیه TCE دارند. اگرچه، در اثر دگرگونی‌هـای کومتـابولیـک بـازدارنـدگی رقـابتی در ترکیـب هدف افزایش می‌یابد اما همچنان می‌تواند پیامدهای سـمی نیز اعمال کند. به دلیل پایین بودن ضـریب تمایل SDIMOها به TCE، به طور بالقوه تاثیر آن‌ها در پالایش کومتابولیک بیشـتر است. بنابراین، کمتر تحت تاثیر بازدارندگی رقابتی قرار می‌گیرند. مفهوم ظرفیت دگرگونی برای توضـیح این پیامدها ارائه شـده اسـت (آلوارز-کوهن و مک‌کارتی، ۱۹۹۱a؛ ۱۹۹۱b). به تازگی، این مفهوم بیشـتر مورد توجه قرار گرفته اسـت، و شـواهد تجربی حاکی از آن اسـت که عملکرد دگرگونی کومتابولیکی دو آنزیم که از نظر سـینتیکی متمایز هستند، بر اساس غلظت سوبسترا تغییر می‌کند (لی و همکاران، ۲۰۰۶).

۵-۳-۳-راه‌کارهایی برای کاربرد میدانی

تمـامی جـانـداران توانایی تجزیه همه آلاینده‌ها را ندارند و حتی آن‌هایی که این توانایی را دارند در تمامی شـرایط عمل نمی‌کنند. اسـاسـاً، هدف زیست‌پالایی داشتن جاندارانی مناسب و بیان ژن‌های مناسـب در شـرایط مناسـب اسـت. بسـیار بعید اسـت که در هر مکان آلوده‌ای شرایط بهینه حذف آلودگی به طور طبیعی وجود داشـته باشـد. فرصـت بهبود کارایی این فرایند تقریباً همیشـه وجود خواهد داشت، اما عملی بودن آن نیز باید مورد توجه قرار گیرد. سطح آلودگی به ندرت همگن است و به ویژه در جایی که آلودگی‌ها به وسیله آب زیرزمینی منتقل می‌شوند، می‌تواند بسیار بزرگ باشد. هزینه‌های اقتصـادی (و زیسـت محیطی) دست‌کاری شرایط مکانی در مقیاس وسیع می‌تواند بسیار زیاد باشـد. از دیدگاه عملی، هدف از زیسـت‌پالایی شـناسایی شرایط بهینه برای فرایند نیست، بلکه هدف شناسایی عواملی است که در صورت وجود، مستعد دست‌کاری هستند و احتمالاً نتایج مفیدی را ارئه می‌دهند. در زیسـت‌پالایی در محل، پایشِ کاهش طبیعی غلظت آلاینده اولین گام اسـت. در جایگاهی که دسـت‌کاری مناسب تشخیص داده شود، دو راه‌کار وجود دارد: تحریک زیستی و تقویت زیســتی. در رویکرد تحریک زیســتی، فعالیت میکروبیوتای طبیعی (بومی) با تامین ســوبســترا یا دسـت‌کاری محیط فیزیکوشـیمیایی به سـمت فعالیت‌های مطلوب هدایت می‌شـود. در این روش جانداران بیان کننده SDIMO ها به سـبب فیزیولوژی متمایزشـان به آسـانی مورد اسـتفاده قرار می‌گیرنـد. بـا توجـه بـه این‌کـه بیشـــتر SDIMOهـا نقش فیزیولوژیکی محدودی (بیشـــتر برای سـوبسـتراهای غیرمعمول) دارند، از نظر علمی این امکان وجود دارد که محیط به صـورت انتخابی برای آن‌ها غنی‌سازی شود. در تقویت زیستی، مرحله اضافی دیگری وجود دارد و آن مایه‌زنی محیط

با جانداران مناسب است. در تمامی موارد، نقشی برای نظارت بر جامعه (میکروبی) به منظور هدایت تصمیم‌های مدیریتی وجود دارد.

۵-۴-نظارت بر جوامع میکروبی

بودن جانداران در یک جایگاه آلوده و فعالیت آن‌ها، این پتانسیل را دارد که از طریق آن‌ها به اطلاعات زیادی در رابطه با تصمیم‌گیری‌های مدیریت مکانی رسید (هِد، ۱۹۹۸). به طور کلی، ساختار جامعه یک زیست‌بوم هم اطلاعات تاریخی از جایگاه را دارد (فراوانی نسبی جانداران بیانگر موفقیت‌ها و شکست‌های اکولوژیک در گذشته است) و هم شاخصی از توانایی زیست‌شیمیایی فعلی به دست می‌دهد. به این ترتیب، اطلاعات جامعه می‌تواند به عنوان مبنایی برای انتخاب راهبردهای مدیریت مکانی مناسب، یا برای تایید نتایج راهبردهای مدیریتی کنونی، مورد استفاده قرار گیرد. دو روش برای ارزیابی جوامع وجود دارد، که شامل استفاده از روش‌های وابسته به کشت[1] (جداسازی جانداران) یا غیروابسته به کشت[2] (مبتنی بر اسید نوکلئیک) است. از آن‌جا که هر دوی این روش‌ها مزایایی داشته و از کاستی‌هایی هم رنج می‌برند، به آن‌ها بیشتر به عنوان روش مکمل نگاه می‌شود تا روش جایگزین رقابتی (گری و هِد، ۲۰۰۱).

۵-۴-۱-نمونه‌برداری بر مبنای کشت برای جانداران تجزیه‌کننده

ضعف اساسی روش‌های مبتنی بر کشت این است که در آن‌ها نمونه گرفته شده از جامعه نماینده واقعی آن نیست و بنابراین تهیه نمونه از جمعیت اکولوژیک رایج مستعد شکست است (هِد و همکاران، ۱۹۹۸). این موضوع به طور گسترده‌ای بحث شده و در این‌جا تنها به طور خلاصه مطرح خواهد شد. جاندارانی که از آلاینده‌ها استفاده (تغذیه) کرده و رشد می‌کنند به سادگی قابل جداسازی هستند. از لحاظ نظری، روش‌های کشت با کارایی بالا یا روش‌های کشت حاوی مولکول‌های ترکیب شونده مانند کاوش ایزوتوپی پایدار می‌توانند به طور موثری تمامی جانداران مربوط به تجزیه‌ی مرتبط با رشد را نمونه‌برداری کنند. چنین روش‌هایی ممکن است برای ارزیابی موفقیت احتمالی کاهش طبیعی (غلظت آلاینده) به عنوان یک راه‌کار مدیریت مکانی، یا برای تایید موفقیت راه‌کار تحریک زیستی (یعنی غنی‌سازی یک گروه هدف شناخته شده) موثر واقع شوند. به هر روی، راه‌کارهای مبتنی بر کشت نمی‌توانند توانایی تجزیه کومتابولیکی را به طور موثر در درون یک جامعه پیش‌بینی کنند. هیچ راه‌کار وابسته به غنی‌سازی کلی برای بازیابی تمامی جانداران مرتبط با کاربردهای کومتابولیکی وجود ندارد. جانداران بیان کننده SDMO یک مثال کلاسیک

1. Culture-dependent
2. Culture-independent

(قدیمی) از این محدودیت است. دیده شده است که آنزیم‌هایی از زیرگروه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ همگی می‌توانند اِتن‌های کلردار را تجزیه کومتابولیک کنند. اما آنزیم‌های گروه‌های ۱ و ۲ بیشتر به عنوان آروماتیک منواکسیژناز (فوتاما و همکاران، ۲۰۰۳؛ هاپکینز و همکاران، ۱۹۹۳و ۱۹۹۷)، آنزیم‌های گروه ۳ هم به عنوان متان منواکسیژناز (لی و همکاران، ۲۰۰۶) و هم به عنوان بوتان مونواکسیژناز (هِلزی و همکاران، ۲۰۰۵)، آنزیم‌های زیرگروه ۴ به عنوان اِتن مونواکسیژناز (کُلمن و اِسپین، ۲۰۰۳b) و آنزیم‌های زیرگروه ۵ به عنوان پروپان منواکسیژناز (کُنن و همکاران، ۲۰۰۵) عمل می‌کنند. نقش‌های فیزیولوژیکی محدود و متمایز منواکسیژنازهای دی- آهن محلول مختلف بدان معنی است که غنی‌سازی هر کدام از سوبستراها (مثلاً متان) تنها حضور برخی از تجزیه‌کنندگان بالقوه TCE (نه همه آنها) را آشکار می‌کند.

۵-۴-۲-نمونه‌برداری غیروابسته به کشت برای جانداران تجزیه‌کننده

تحول در بوم‌شناسی میکروبی با استفاده از روش‌های مولکولی برای توصیف جوامع میکروبی آغاز شد. تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های rRNA از کل DNA محیطی، جامع‌ترین دیدگاه موجود از ساختار جامعه میکروبی را ارائه می‌دهد. از کاستی‌های این روش این است که حجم داده‌ها زیاد بوده که در بیشتر موارد تفسیر آن‌ها آسان نیست. دو مورد از بزرگ‌ترین مشکل‌های این روش که جای بحث دارد، یکی طبقه‌بندی بر اساس روابط توالی است که به پایگاه داده‌ها وابسته است و دیگری استفاده از مجموعه داده‌های توالی است که خود به طبقه‌بندی قوی وابسته است. در نتیجه، پیش‌بینی فیزیولوژی جانداران کشت نشده از داده‌های توالی rRNA بسیار دشوار است و طبقه‌بندی توالی‌های بسیار متفاوت هم می‌تواند مبهم شود. مشکل اول به ویژه در رابطه با جانداران تجزیه‌کننده جدی است، چراکه ژن‌های مرتبط بیشتر روی پلازمیدها یا دیگر عناصر متحرک بوده که هم‌بستگی بسیار ضعیفی با فیلوژنی rRNA دارند.

یک راه حل ممکن برای این موارد، استفاده از ژن‌های تشخیصی متابولیکی (در منابع به آن‌ها کاوشگرهای ژن‌های عملکردی[1] گفته می‌شود) به جای ژن‌های 16S rRNA برای شناسایی ساختار جامعه است. ژن‌های نشان‌گر تشخیصی متابولیکی تنها در یک زیرمجموعه از جامعه وجود دارند و بنابراین پیچیدگی مجموعه نمونه‌ها را تا حد زیادی کاهش می‌دهند. سود این روش در زیست‌پالایی این است که با آن می‌توان کاربرد جانداران بیان کننده‌ی SDIMO را پایش کرد. انتظار می‌رود که طرح طبقه‌بندی قوی برای SDIMOها به طبقه‌بندی توالی‌های به دست آمده از جوامع زیست محیطی کمک کند. هم‌بستگیِ خوبی که ظاهراً بین نقش فیزیولوژیکی و ارتباط توالی آنزیم‌هایی که

1. Functional gene probes

باهم خویشاوند نزدیک هستند، وجود دارد بایستی تفسیر داده‌ها را آسان کند. با این حال، هنوز هم یک پایگاه اطلاعاتی شاخص پیش‌نیازِ نظارت بر جامعه غیروابسته به کشت است.

احتمالاً موفق‌ترین راه‌کار برای بررسی تنوع ژنی کنونی محیط، استفاده از آغازگرهای با طیف تخصصی گسترده برای هدف قرار دادن خانواده ژنی مورد نظر توسط PCR است. در مورد SDIMOها، این روش یعنی گرفتن نمونه‌ای که نماینده‌ی همه ژن‌های SDIMO موجود در محیط باشد، به دلیل محدودیت در طراحی آغازگر نسبتاً دشوار است. زمینه ژنتیکی اُپرون‌ها و ژن‌های منحصر به فرد درون اُپرون‌های SDIMO در خانواده‌های فرعی مختلف تغییر می‌کند. این بدین معنی است که هر راه‌کار مبتنی بر PCR برای بازیابی توالی، محدود به استفاده از جفت آغازگرهای درون یک ژن است. در مورد SDIMOها، واگرایی توالی هر ژن به گونه‌ای است که طراحی یک مجموعه‌ی واحد از آغازگرهای «عمومی» که قادر به هدف قرار دادن تمامی SDIMOها در PCR باشند امکان‌پذیر نیست. این محدودیت بدان معنی است که تلاش‌ها برای بازیابی تنوع ژنی SDIMO مبتنی بر PCR در زیرگروه‌های ویژه متمرکز شده است. مجموعه‌ی آغازگر برای گروه ۱ (بالدوین و همکاران، ۲۰۰۳)، گروه ۲ (بالدوین و همکاران، ۲۰۰۶، باسیل و اریمان، ۲۰۰۸)، گروه ۳ sMMO ها (مک‌دونالد و همکاران، ۱۹۹۵)، و گروه‌های ۴، ۵ و ۶ (کُلمن و همکارن، ۲۰۰۶) ارائه شده است.

کاربرد این آغازگرها برای بررسی ساختار جامعه می‌تواند نتایج مفیدی را آشکار سازد. یک مثال خوب در این زمینه آلکن منواکسیژناز است. از آغازگرهای اختصاصی گسترده که به وسیله کُلمن و همکاران (۲۰۰۶) ارائه شده برای مقایسه تنوع ژن‌های SDIMO موجود در محدوده‌ای از محیط‌های طبیعی و کشت‌های غنی شده با اِتن استفاده شده است. تنوع بسیار بالا در محیط‌های طبیعی دیده شد، اما یک توزیع شدیداً اُریب به سمت گروه ۴ SDIMO ها در محیط‌های غنی از اِتن و در مکان‌های آلوده با اِتن‌های کلردار دیده شد. تفسیر این یافته نشان می‌دهد که اِتن برای زیرمجموعه‌ای از جانداران دارای SDIMO بسیار انتخابی است (کُلمن و همکارن، ۲۰۰۶). روش‌های مبتنی بر کشت اُریبی یکسانی را به سمت بازیافت یک مجموعه بسیار اندک از SDIMO ها نشان دادند که پیش‌تر برای فنل و متان هم دیده شده بود. مشاهده مواردی این چنین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی زیاد ما را مطمئن‌تر می‌کند که بسیاری از SDIMOها نقش‌های فیزیولوژیکی قابل پیش‌بینی دارند.

اهمیت این مشاهده‌ها در این است که SDIMOها می‌توانند به عنوان پروب‌های تشخیصی متابولیکی برای هر دو فرایند زیست‌پالایی مرتبط با رشد و کومتابولیک بسیار مفید باشند.

پیشرفت‌های اخیر در توسعه فناوری ریزآرایه[1] در زمینه میکروبیولوژی محیطی (بُدراسی و همکاران، ۲۰۰۶) این امید را می‌دهد که فرصت‌های زیادی برای افزایش زیست‌پالایی با استفاده از SDIMOها ایجاد شود. گسترش پایگاه‌های اطلاعاتی سبب شناسایی گروه‌های جدیدی از SDIMOها (کُلمن و همکاران، ۲۰۰۶) و ساخت ریزآرایه‌های شاخص برای بررسی تنوع در گروه‌های خاص شده‌اند (بُدراسی و همکاران، ۲۰۰۳؛ آیوی و همکاران، ۲۰۰۷).

۵-۵-نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد زمانی‌که منابع محدود کربن چه در آزمایشگاه برای غنی‌سازی و چه برای تحریک زیستی در محل، فراهم باشد، احتمالاً جانداران پاسخگو مجموعه‌ی محدودی از SDIMOها را بروز خواهند داد. اطلاعات موجود حاکی از آن است که سوبستراهایی که ممکن است جانداران دارای زیرگروه‌های ویژه SDIMO را تحریک کنند شامل تولوئن (گروه ۱)، فنل (گروه ۲)، متان (گروه ۳)، و اِتن/ پروپن (گروه ۴) هستند. دیگر سوبستراهایی که ارزش پژوهش بیشتر را دارند شامل بوتان (گروه ۳) و پروپن (گروه ۵، گروه ۶) هستند. در دسترس بودن جانداران مدل از هر کدام از این گروه‌ها برای کشت آزمایشگاهی، برآوردها در مورد طیف ویژگی‌های سینتیکی و محدوده سوبسترا در این گروه‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. ترکیبی از ویژگی‌های قابل پیش‌بینی آنزیم، با توانایی نظارت بر هر دو مورد جامعه سلولی و سطوح بیان ژن‌های SDIMO متفاوت، احتمالاً سبب پیشرفت چشم‌گیر در زیست‌پالایی کومتابولیک در آینده‌ای نزدیک خواهد شد.

1. Microarray

منابع

Alvarez-Cohen L, McCarty PL (1991a) A cometabolic biotransformation model for halogenated aliphatic-compounds exhibiting product toxicity. Environ Sci Technol 25:1381–1387.

Alvarez-Cohen L, McCarty PL (1991b) Product toxicity and cometabolic competitive-inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. Appl Environ Microbiol 57:1031–1037.

Baldwin BR, Nakatsu CH, Nies L (2003) Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. Appl Environ Microbiol 69:3350–3358.

Baldwin BR, Nakatsu CH, Nies L (2008) Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. Water Res 42:723–731.

Basile LA, Erijman L (2008) Quantitative assessment of phenol hydroxylase diversity in bioreactors using a functional gene analysis. Appl Microbiol Biotechnol 78:863–872.

Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell JC, Radajewski S, Weilharter A, Sessitsch A (2003) Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. Environ Microbiol 5:566–582.

Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Konrad-Koszler M, Weilharter A, Reichenauer TG, Schofer D, Sessitsch A (2006) mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by use of a diagnostic microarray. Appl Environ Microbiol 72:1672–1676.

Champreda V, Zhou NY, Leak DJ (2004) Heterologous expression of alkene monooxygenase components from Xanthobacter autotrophicus Py2 and reconstitution of the active complex. FEMS Microbiol Lett 239:309–318.

Colby J, Stirling DI, Dalton H (1977) Soluble methane Monooxygenase of Methylococcus capsulatus (Bath) — ability to oxygenate normal-alkanes, normal-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic-compounds. Biochem J 165:395–402.

Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, Spain JC (2002) Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. Appl Environ Microbiol 68: 6162–6171.

Coleman NV, Spain JC (2003a) Distribution of the coenzyme m pathway of epoxide metabolism among ethene- and vinyl chloride-

degrading Mycobacterium strains. Appl Environ Microbiol 69:6041–6046.

Coleman NV, Spain JC (2003b) Epoxyalkane: Coenzyme M transferase in the ethene and vinyl chloride biodegradation pathways of Mycobacterium strain JS60. J Bacteriol 185:5536–5545.

Coleman NV, Bui NB, Holmes AJ (2006) Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments. Environ Microbiol 8:1228–1239.

Connon SA, Tovanabootr A, Dolan M, Vergin K, Giovannoni SJ, Semprini L (2005) Bacterial community composition determined by culture-independent and -dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater. Environ Microbiol 7:165-178.

Dedysh SN, Knief C, Dunfield PF (2005) Methylocella species are facultatively methanotrophic. J Bacteriol 187:4665-4670.

Dumont MG, Murrell JC (2005) Community-level analysis: key genes of aerobic methane oxidation. Environ Microbiol 7:413–427.

Futamata H, Harayama S, Watanabe K (2001) Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. Appl Environ Microbiol 67:4671–4677.

Futamata H, Harayama S, Hiraishi A, Watanabe K (2003) Functional and structural analyses of trichloroethylene-degrading bacterial communities under different phenol-feeding conditions: laboratory experiments. Appl Microbiol Biotechnol 60:594–600.

Futamata H, Nagano Y, Watanabe K, Hiraishi A (2005) Unique kinetic properties of phenoldegrading Variovorax strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. Appl Environ Microbiol 71:904–911.

Gray ND, Head IM (2001) Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. Environ Microbiol 3:481–492

Haase K, Wendlandt KD, Graber A, Stottmeister U (2006) Cometabolic degradation of MTBE using methane-propane- and butane-utilizing enrichment cultures and Rhodococcus sp BU3. Eng Life Sci 6:508–513.

Halsey KH, Sayavedra-Soto LA, Bottomley PJ, Arp DJ (2005) Trichloroethylene degradation by butane-oxidizing bacteria causes a spectrum of toxic effects. Appl Microbiol Biotechnol 68:794–801

Head IM (1998) Bioremediation: towards a credible technology. Microbiology 144:599–608.

Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microb Ecol 35:1–21.

Holmes AJ, Coleman NV (2008) Evolutionary ecology and prospecting for monooxygenases as biocatalysts. Anton van Leeuwenh 94:75–84.

Hopkins GD, Semprini L, McCarty PL (1993) Microcosm and in-situ field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms. Appl Environ Microbiol 59:2277–2285.

Hopkins GD, Goltz MN, Allan JP, Dolan ME, McCarty PL (1997) Full-scale in-situ cometabolic biodegradation of trichloroethene-contaminated groundwater through toluene injection. In: Abstracts of papers of the American Chemical Society, pp 213, 54-ENVR.

Iwai S, Kurisu F, Urakawa H, Yagi O, Furumai H (2007) Development of a 60-mer oligonucleotide microarray on the basis of benzene monooxygenase gene diversity. Appl Microbiol Biotechnol 75:929–939.

Leahy JG, Batchelor PJ, Morcomb SM (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. FEMS Microbiol Rev 27:449–479.

Lee SW, Keeney DR, Lim DH, Dispirito AA, Semrau JD (2006) Mixed pollutant degradation by Methylosinus trichosporium OB3b expressing either soluble or particulate methane monooxygenase: Can the tortoise beat the hare? Appl Environ Microbiol 72:7503–7509.

Mahendra S, Petzold CJ, Baidoo EE, Keasling JD, Alvarez-Cohen L (2007) Identification of the intermediates of in vivo oxidation of 1,4-dioxane by monooxygenase-containing bacteria. Environ Sci Technol 41:7330–7336.

Mattes TE, Coleman NV, Spain JC, Gossett JM (2005) Physiological and molecular genetic analyses of vinyl chloride and ethene biodegradation in Nocardioides sp strain JS614. Arch Microbiol 183:95–106.

McDonald IR, Kenna EM, Murrell JC (1995) Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. Appl Environ Microbiol 61:116–121.

McDonald IR, Miguez CB, Rogge G, Bourque D, Wendlandt KD, Groleau D, Murrell JC (2006) Diversity of soluble methane monooxygenase -containing methanotrophs isolated from polluted environments. FEMS Microbiol Lett 255:225–232.

Notomista E, Lahm A, Di Donato A, Tramontano A (2003) Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. J Mol Evol 56: 435–445.

Park JB (2007) Oxygenase-based whole-cell biocatalysis in organic synthesis. J Microbiol Biotechnol 17:379–392.

Sharp JO, Sales CM, LeBlanc JC, Liu J, Wood TK, Eltis LD, Mohn WW, Alvarez-Cohen L (2007) An inducible propane monooxygenase is responsible for N-nitrosodimethylamine degradation by Rhodococcus sp strain RHA1. Appl Environ Microbiol 73:6930–6938.

Theisen AR, Ali MH, Radajewski S, Dumont MG, Dunfield PF, McDonald IR, Dedysh SN, Miguez CB, Murrell JC (2005) Regulation of methane oxidation in the facultative methanotroph Methylocella silvestris BL2. Molecul Microbiol 58:682–692.

Urlacher VB, Eiben S (2006) Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. Trends Biotechnol 24:324–330.

Urlacher VB, Schmid RD (2006) Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. Curr Opin Chem Biol 10:156–161.

van Beilen JB, Funhoff EG (2005) Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. Curr Opin Biotechnol 16:308–314.

van Berkel WJH, Kamerbeek NM, Fraaije MW (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. J Biotechnol 124:670–689.

Wackett LP (2002) Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. Enz Microb Technol 31:577–587.

Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. Appl Environ Microbiol 64:4396–4402.

Watanabe K, Futamata H, Harayama S (2002) Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. Anton van Leeuwenh 81:655–663.

فصل ششم

پالایش زیستی خاک آلوده

A.K.J. Surridge, F.C. Wehner, and T.E. Cloete

۶-۱- مقدمه

صنعت جهانی به سوخت‌های فسیلی به عنوان اولین منبع انرژی وابسته است. در فرآیند صادرات، واردات و فرآوری سوخت‌های فسیلی خطر بالای آلودگی زیست محیطی وجود دارد. در نتیجه ایجاد مواد جنبی سوختی و ریخته شدن آن‌ها در جاهایی که ذخیره، انتقال، تصفیه، توزیع و مصرف مواد سوختی و صنایع وابسته به مواد سوختی وجود دارد، اختلال شدید بوم‌شناختی در محیط ایجاد می‌شود.

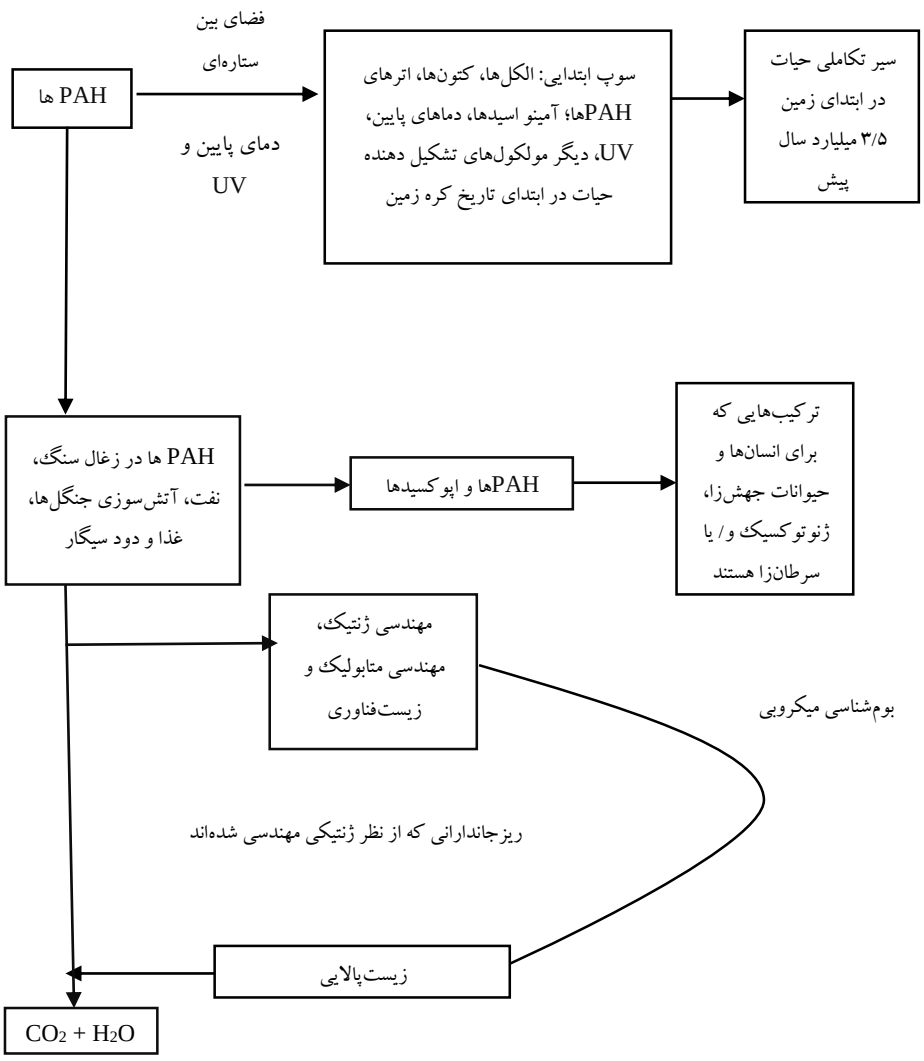
از زمانی‌که به نظر می‌رسید متان و دیگر هیدروکربن‌های زنجیره بلند منحصراً ناشی از فرآیندهای زیستی باشند، به هیدروکربن‌ها به عنوان موادی که منشا زیستی دارند، نگاه می‌شد. البته روشن است که بزرگ‌ترین منبع فراهم کننده کربن در سیاره هیدروکربن‌ها هستند. زغال سنگ و نفت دارای گروهی از مولکول‌ها به نام هوپانوییدها[1] هستند که معمولاً در دیواره یاخته باکتری‌ها یافت می‌شود (گُلد، ۱۹۸۵). بنابراین می‌شود نتیجه گرفت که در برخی نقاط همه این سوخت‌ها، حداقل تا حدی، از میکروب‌ها ناشی شده‌اند. بر همین اساس می‌شود فرض کرد که تجزیه زیستی این سوخت‌ها همیشه تا حدی امکان‌پذیر است. در تعمیم این مطلب می‌توان گفت که منشا زیستی این هیدروکربن‌ها می‌تواند دلیل سازگاری میکروب‌ها به تجزیه آسان آن‌ها، حتی با وجود صنعتی شدن زمین باشد و این‌که چرا گیاه‌پالایی یک روش کاربردی برای اصلاح و بهبود خاک‌های آلوده است را می‌توان با این فرض توضیح داد. ریزجانداران طبیعی و حاصل از مهندسی ژنتیک می‌توانند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAH ها) سمی را به دی‌اکسید کربن و آب معدنی تبدیل کنند (شکل ۶-۱).

در خاک آلوده به نفت، ایزومرهای بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) در بخش محلول در آب وجود دارند که سبب آلودگی می‌شوند (پرنافتا-بولدو و همکاران، ۲۰۰۲). اما بدنام‌ترین گروه ترکیب‌های خطرناک که در نفت، گازوئیل، روغن‌های هیدروکربنه و همین‌طور قطران زغال سنگ و مشتقات آن یافت می‌شوند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAH ها) هستند. PAH ها ترکیب‌های شیمیایی آب‌گریزی هستند که دارای حلقه‌های به هم جوش خورده آروماتیک، بدون هترواتم (اتم‌هایی به جز کربن و هیدروژن) بوده و زیرواحد ندارند. به عنوان مثال می‌توان به نفتالن، آنتراسن، فنانترن، بنزو(ای)پایرن[2]، کرونِن[3]، پایرن، تری‌فنیلن، کرایسن[4]، و بنزو (جی)پایرن[5] اشاره

1. Hopanoids
2. Benzo(a)pyrene
3. Coronene
4. Chrysene
5. Benzo(ghi)pyrene

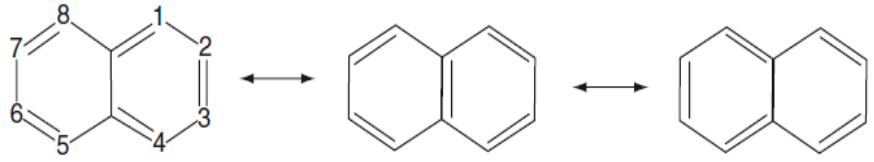
نمود (ویکی‌پدیا، ۲۰۰۵a). PAH ها که به سرطان‌زا بودن معروف هستند با سوختن ناقص مواد سوختی کربن‌دار مانند چوب، زغال سنگ، گازوئیل، چربی و تنباکو ایجاد می‌شوند. به آن‌هایی که چهار حلقه بنزنی دارند، PAH های سبک گفته می‌شود که ساده‌ترین آن‌ها بنزوسیکلوبوتن (C8H6) است. آن‌هایی که حلقه بنزنی بیشتری دارند PAH های سنگین هستند که پایدارتر و سمی‌تر هستند. نفتالن و تولوئن که در فرآورده‌هایی مانند نفت و گازوئیل یافت می‌شوند، دو نمونه از PAH های معمول هستند که در معرض تجزیه زیستی قرار دارند. نفتالن هیدروکربنی جامد، سفید رنگ، آروماتیک و کریستالی است که فرار بوده و بخار قابل اشتعال ایجاد می‌کند. نام آن از واژه لاتین *نفتا*[1] گرفته شده که به معنی قیر مایع است و واژه‌ای با ریشه سامی است. نفتالن از دو حلقه بنزن جوش خورده به هم تشکیل شده (شکل ۶-۲) و در گروه PAH های بنزنوئید طبقه‌بندی و از قطران زغال سنگ ساخته می‌شود. در صورت تبدیل شدن به فتالیک انهیدرید، از آن در صنعت پلاستیک‌سازی، رنگ‌ها و حلال‌ها و به عنوان ضدعفونی کننده و حشره‌کش استفاده می‌شود (ویکی‌پدیا، ۲۰۰۵b).

1. *Naphtha*

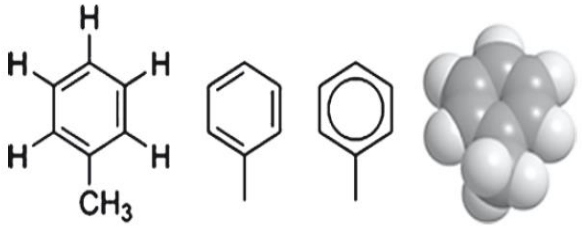


شکل ۶-۱ سرنوشت، سمیت و پالایش PAH ها در محیط

تولوئن که به آن متیل‌بنزن یا فنیل متان گفته می‌شود یک مایع شفاف نامحلول در آب است. نام آن از *تولیوآل*[1] گرفته شده که به تولو بالزام اشاره داشته و عصاره معطری از درخت *میروکسیلون بالزامون* (.L) هارمز[2] است، که برای اولین بار این ماده از آن گرفته شده است (ویکی‌پدیا ۲۰۰۵c). تولوئن هیدروکربن آروماتیک با زنجیره‌ی کناری متیل است (شکل ۶-۳) که به عنوان ماده اولیه صنعتی، تقویت کننده اکتان در سوخت، حلال در رنگ‌ها، لاستیک‌سازی، صنعت چاپ، چسب‌ها، لاک‌ها، چرم‌سازی، ضدعفونی‌کننده‌ها، و تولید فنول، کف پلی‌یورتان و تی‌ان‌تی کاربرد دارد (ویکی‌پدیا، ۲۰۰۵c).



شکل ۶-۲ ساختار مولکولی دینامیک نفتالن



شکل ۶-۳ ساختار مولکولی تولوئن

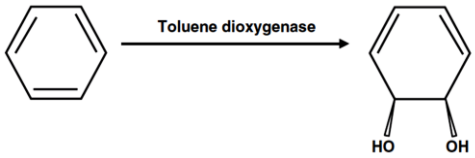
منابع هیدروکربنی بر محیط زیست و به ویژه خاک تاثیر می‌گذارند. اختلال در خاک که توسط این ترکیب‌ها ایجاد می‌شود سبب کاهش تنوع زیستی شده و گونه‌هایی از میکروب‌ها را انتخاب می‌کند که سازگاری بهتر به زنده ماندن در این محیط تغییر یافته را دارند (لینستورم و همکاران، ۱۹۹۹؛ کُزدروج و ون السـاس، ۲۰۰۱). تغییرات زیست محیطی ایجاد شده توسط این آلاینده‌ها بر ساختمان و حاصل‌خیزی خاک تاثیر گذاشته و بنابراین بر فونا و فلورای خاک نیز موثرند. خاک‌های تاثیر پذیرفته از این آلاینده‌ها نسبتاً سترون شده و در آن‌ها تنها میکروب‌های مقاوم یافت می‌شوند. برخی از ریزجاندارن بومی خاک شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه PAHها در خاک هستند و سبب بازسازی خاک‌های آلوده می‌شوند. استفاده از این ریزجانداران در سمیت‌زدایی و بازسازی

1. *Toluol*
2. *Myroxylon balsamum* (L.) Harms

خاک‌های آلوده به PAH یک روش موثر، اقتصادی، چندجانبه و سازگار از نظر اکولوژیکی در اصلاح خاک‌های آلوده است (گوئرین، ۱۹۹۹؛ بوگان و همکاران، ۲۰۰۱؛ مارگزین و شینر، ۲۰۰۱؛ میشرا و همکاران، ۲۰۰۱؛ تسار و همکاران، ۲۰۰۲).

گنجایش حذف زیستی یک خاک را می‌توان با مایه‌زنی توسط سویه خاص یا مجموعه‌ای از ریزجانداران بهبود بخشید (هالدن و همکاران، ۱۹۹۹؛ دی‌جونگه و همکاران، ۲۰۰۱). در این راستا، به ویژه آن‌هایی که از رایزوسفر گیاهان جدا می‌شوند، مهم هستند. چرا که به خاطر ویژگی بافری که در حضور گیاه میزبان آن‌ها ایجاد می‌شود، پایدارترند. با این حال، ریزجانداران رایزوسفری اگر در محیط زنده و غیرزنده هم ساکن شوند، پایدار هستند (باهمه و همکاران، ۱۹۸۸). ایزومرهای BTEX بیشترین حساسیت به حذف از محیط توسط ریزجانداران بومی را دارند. با این حال، کمبود ریزمغذی‌ها در سیستم طبیعی ممکن است مانع تجزیه این‌ها شود (کویزیومی و همکاران، ۲۰۰۲). پالایش معمولاً تحت تاثیر مقدار کربن آزاد، نیتروژن و فسفر قابل دسترس قرار می‌گیرد (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱؛ مارگزین و شاینر، ۲۰۰۱؛ رولینگ و همکاران، ۲۰۰۲). نیتروژن مهم‌ترین عنصر در این زمینه است که در شرایط محدود بودن تغذیه‌ای موردنیاز می‌شود. چراکه در ساخت پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و سایر اجزای یاخته‌ای به کار می‌رود. نیتروژن عنصری که به گونه گازی در اتمسفر وجود دارد، به خاطر پایدار بودن پیوند سه گانه بین دو اتم نیتروژن معمولاً بی‌اثر است. بنابراین، نیتروژن عنصری بایستی توسط باکتری‌های خاک برای رشد گیاهان، موریانه‌ها و پروتوزوآها تثبیت شود (دیکان، ۲۰۰۴). با این حال برخی استثناها درباره رابطه تثبیت سینرژیستی نیتروژن بین باکتری‌ها، گیاهان، موریانه‌ها و پروتوزوآها وجود دارد. استروترز و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که علف‌کش آترازین در خاک، بدون افزودن منابع کربن و نیتروژن اضافی توسط *اگروباکتریوم رادیوباکتر*[1] تجزیه شد. باوجود این، تزریق عناصر غذایی محلول مانند منابع نیتروژنی در چند سانتی‌متری زیر سطح خاک می‌تواند سبب افزایش شمار جوامع میکروبی شود. در فرآیند پالایش زیستی از نیترواکسید گازی برای فراهم کردن نیتروژن در خاک‌های آلوده استفاده شده است (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). ثابت شده که افزایش عناصر غذایی مانند کودهای نیتروژنی به خاک سبب افزایش تجزیه زیستی PAH ها می‌شود (کاسای و همکاران، ۲۰۰۲).

1. *Agrobacterium radiobacter*



شکل ۶-۴ کاتابولیسم PAH های دو تا چهارحلقه‌ای با هیدروکربن آروماتیک دی‌اکسیژناز

اولین برآورد مستقیم (مستقل از کشت میکروبی) از شمار پروکاریوت‌ها در خاک نشان داد که در هر گرم خاک، ۴۶۰۰ ژنوم مجزا وجود دارد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). استخراج DNA و RNA با روش‌های ژنتیک مولکولی، سبب آسان شدن آنالیز جوامع میکروبی شده که نتایج آن را می‌توان با تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی همراه کرد (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). تنوعی که مبتنی بر کشت میکروبی نباشد، گونه‌هایی را که وابستگی نزدیک به گونه‌های قابل کشت شناخته شده دارند و همچنین گونه‌هایی را که ظاهراً اجداد کشت نشده دارند نشان می‌دهد (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). شناسایی ژن‌های میکروبی درگیر در تجزیه آلاینده‌های آلی سبب کاربرد روش‌های مولکولی در اکولوژی میکروبی مناطق آلوده شده است (ملسیک-ترژیک و همکاران، ۲۰۰۱).

روش‌های مولکولی معمولاً شامل جدا کردن محصولات PCR بر اساس تفاوت توالی‌های نوکلئوتیدی DNA است که در بیشتر موارد مبتنی بر ژن 16S rRNA است. این روش‌ها شامل الکتروفورز روی ژل با شیب واسرشته کننده[1] (DGGE)، آنالیز فضای بین ژنی ریبوزومی[2] (RISA)، چندشکلی آرایش فضایی تک رشته‌ای[3] (SSCP)، آنالیز محدود DNA ریبوزومی تکثیر شده[4] (ARDRA) و چندشکلی در طول قطعات برش خورده انتهایی[5] (T-RFLP) است. بیشتر این روش‌ها در صورتی تنوع را نشان می‌دهند که جامعه ساده باشد. چراکه تنها تعداد بسیار کمی از گونه‌ها در هیبریداسیون دوباره یا آنالیز توالی‌ها روی ژل دیده می‌شوند (لیندرمن، ۱۹۸۸؛ بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). با این حال روش DDGE برای پژوهش‌های آلودگی کاربردی است چراکه به خاطر فشار انتخاب طبیعی روی میکروب‌ها، انتظار می‌رود تنوع در خاک‌های آلوده به PAH پایین باشد. افزون بر این، از پروب‌های ژن‌های کاتابولیکی[6] هم می‌توان در آنالیز هیبریداسیون اسید نوکلئیک برای شناسایی توالی‌ها استفاده کرد (ماکاتسو و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین DGGE

1. Denaturing gradient gel electrophoresis
2. Ribosomal intergenic spacer analysis
3. Single-strand conformation polymorphism
4. Amplified ribosomal DNA restriction analysis
5. Terminal restriction fragment length polymorphism
6. Catabolic gene probes

امکان توصیف تفاوت‌های عمده بین جوامع و آزمون فرضیه بر مبنای مقایسه نمونه‌ها را هم فراهم می‌کند (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳).

روش DGGE که به تازگی توسعه یافته است یک روش ایده‌آل مولکولی برای پایش اکولوژی میکروبی است. این روش مبتنی بر تغییر در توالی ژنتیکی نواحی تکثیر شده‌ی ویژه برای تمایز بین گونه‌ها در درون جوامع میکروبی است (بنکس و آلِمَن، ۲۰۰۲؛ کویزیومی و همکاران، ۲۰۰۲). DGGE امکان غربال کردن هم‌زمان تعداد زیادی از نمونه‌ها را فراهم می‌کند و بنابراین آنالیزهای با طیف گسترده را آسان می‌کند. فرآورده PCR روی ژل پلی‌اکریل آمید که دارای شیب خطی واسرشت کننده DNA است، الکتروفورز می‌شود. الگوی باندها روی ژل ردپای ژنتیکی برجای می‌گذارد که همه جامعه مورد بررسی را در بر می‌گیرد (گیلان، ۲۰۰۴). تصویر ژل به صورت دیجیتال گرفته شده و برای شناسایی گونه‌ها هنگامی‌که در برابر گونه استاندارد شناخته شده، اجرا می‌شوند به کار می‌رود (تِمرمن و همکاران، ۲۰۰۳). معمولاً بیشتر از ژن‌های 16S rRNA برای شناسایی ترکیب گونه‌های باکتریایی نمونه استفاده می‌شود. توالی جزئی این ژن از جوامع پیچیده‌ای مانند خاک آنالیز شده است (تروباک و همکاران، ۲۰۰۴).

DGGE امکان تعیین کل جامعه یا جامعه خاص و تنوع ژن بدون آنالیزهای بیشتر و بدون شناسایی افراد خاص را امکان‌پذیر می‌کند. از این روش برای تعیین تغییرات توالی‌ها در چند ژن و در بین چند موجود به صورت هم‌زمان استفاده شده است (مویزر و همکاران، ۱۹۹۳). با این حال از ژن‌های عمل‌کردی که تغییر توالی بیشتری دارند می‌توان برای تمایز گونه‌هایی که خویشاوندی نزدیکی دارند اما از جوامع اکولوژیکی متفاوتی هستند، استفاده کرد. روسادو و همکاران (۱۹۹۸) از آغازگر منحصر به گونه *nifH* باکتری پینی*باسیلوس ازوتوفیکسنس*[1] در آنالیز DGGE نمونه‌های خاک استفاده کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که احتمالاً ژن *nifH* یک ژن دارای چند کپی در این باکتری است و همچنین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را در این ژن عملکردی مهم شناسایی کرد. در ادامه ملسیک-ترزیک و همکاران (۲۰۰۰) کنسرسیوم میکروبی تجزیه کننده گازوئیل، تولوئن و نفتالن را از خاک‌های آلوده به گازوئیل جدا کردند. این پژوهش‌گران با استفاده از PCR با آغازگرهای ژن خاص، حضور ژن‌های کاتابولیکی *xylE* و *ndoB* که به ترتیب مسئول تجزیه زیستی تولوئن/زایلن و نفتالن هستند را در خاک‌های آلوده به نفت و گازوئیل بررسی کردند. این ژن‌ها برای ارزیابی پتانسیل پالایش زیستی کنسرسیوم میکروبی در خاک‌های آلوده به نفت و گازوئیل هدف شناسایی قرار گرفتند (گریر و همکاران، ۱۹۹۳).

1. *Paenibacillus azotofixans*

کشت برخی ریزجاندارن مانند باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن سخت است چرا که نیازهای غذایی و فیزیولوژی ویژه دارند و کشت هم زمان چند گونه از آن‌ها محدود است (ویدمر و همکاران، ۱۹۹۹). امروزه با طراحی آغازگرهای طیف وسیع با دگرگونی بالا، روش‌های مولکولی برای شناسایی باکتری‌ها و آرکی‌های تثبیت کننده نیتروژن در دسترس هستند. ویدمر و همکاران (۱۹۹۹) مجموعه‌ای از آغازگرهای دگرگون شده آشیانه‌ای را بر اساس توالی آمینو اسید ژن *nifH* طراحی کردند. این ژن یک نشان‌گر عمومی در باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن است و آنزیم نیتروژن ریداکتاز را کد می‌کند. همین‌طور، زِهر و مک‌رینولدز (۱۹۸۹)، سیمونت و همکاران (۱۹۹۱) و ییگر و همکاران (۲۰۰۵) سه مجموعه دیگر از آغازگرهای دگرگون شده برای هدف‌گیری کلی ژن *nifH* در ریزجانداران را به طور موفقیت‌آمیزی طراحی کردند. ساختار اُپرون ژن *nif* و تنظیم آن در طی تکامل نسبتاً حفاظت شده است که سبب می‌شود این ژن کاندیدای خوبی برای تمرکز در پژوهش‌های تنوع باشد (گوسین و همکاران، ۱۹۸۶).

۶-۲- سلامت خاک

سلامت خاک را می‌توان به صورت «گنجایش خاک برای عمل کردن به عنوان سیستم زنده حیاتی برای حفظ تولید زیستی، افزایش کیفیت محیط زیست و حفظ سلامت گیاهان و جانوران» تعریف کرد (دوران و زایس، ۲۰۰۰). حاصل‌خیزی و قابلیت تولید سیستم کشاورزی سنتی وابستگی زیادی به عمل‌کرد جامعه میکروبی خاک دارد (گیروان و همکاران، ۲۰۰۳). ساختار و تنوع این جوامع با ساختمان خاک و توزیع مکانی و همین‌طور ارتباط بین فاکتورهای زیستی و غیرزیستی جوامع میکروبی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (تورسویک و اوریاس، ۲۰۰۲). با به وجود آمدن صنایع گوناگون در ۲۰۰ سال گذشته، اکولوژی زیست‌بوم‌های سطح زمین به شدت مختل شده است. تجاری‌سازی، استخراج، تصفیه، انتقال، توزیع و ذخیره فرآورده‌های نفتی سبب آلودگی خاک‌ها به نفت، بنزین و گازوئیل شده است. در آب‌های آلوده به بنزین که به خاک نفوذ می‌کنند، ایزومرهای بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) در بخش محلول در آب وجود دارند (پرینافتا-بولدو و همکاران، ۲۰۰۲). این اختلال سبب کاهش تنوع زیستی شده و گونه‌های میکروبی را در سطح جهانی برگزیده که سازگاری بهتر به زنده‌مانی در این محیط تغییر یافته دارند (کوزدراج و ون‌السساس، ۲۰۰۱). جامعه میکروبی ساکن در خاک هم تحت تاثیر این تغییرات قرار گرفته است.

۶-۳- آلودگی

در حال حاضر، هیدروکربن‌ها به دلیل انرژی که از سوختن آن‌ها ایجاد می‌شود، مهم‌ترین منبع انرژی در دنیا هستند. مواد زائد و ریخته شدن آن‌ها در طبیعت، هیدروکربن‌ها را به مهم‌ترین منبع آلودگی در جهان هم تبدیل کرده است. اساساً سه نوع هیدروکربن وجود دارد: ۱) هیدروکربن‌های آروماتیک که حداقل یک حلقه آروماتیک دارند، ۲) هیدروکربن‌های اشباع شامل اِن-آلکان‌ها، آلکان‌های منشعب و سیکلوآلکان‌ها که پیوند دوگانه، سه‌گانه و آروماتیک ندارند و ۳) هیدروکربن‌های غیراشباع با یک یا چند پیوند دوگانه و سه‌گانه بین اتم‌های کربن که به ترتیب به آن‌ها آلکِن‌ها و آلکین‌ها گفته می‌شود (اتلس، ۱۹۸۱، ویکی‌پدیا، a۲۰۰۶). بدنام‌ترین کلاس از ترکیب‌های خطرناک که در نفت، بنزین و گازوئیل و همین‌طور در زغال‌سنگ و مشتقات آن یافت می‌شود PAHها هستند. پلی‌فنل‌ها و PAHها آلاینده‌های صنعتی معمول هستند و به صورت دو آلاینده هم‌زمان در محیط یافت می‌شوند. آن‌ها ترکیب‌های آلی آب‌گریز متشکل از دو یا چند حلقه بنزن هستند که به یک ساختار آروماتیک منفرد جوش خورده‌اند وبه صورت طبیعی از سوختن ماده آلی یا احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی ایجاد شده‌اند (جونز و همکاران، ۲۰۰۲). هوپان‌ها که ترکیب‌های آلیسیکلیک[1] پیچیده هستند از پایدارترین ترکیب‌های حاضر در محیط با منشا نشت مواد نفتی می‌باشند (اتلس، ۱۹۸۱). آنزیم‌های کبدی پستاندارن (سیتوکروم پی-۴۵۰[2] و اپوکسید هیدرولاز[3]) برخی از PAHها را به دیول-اپوکسایدهای فیورد و بِی ریجن[4] اکسید می‌کند که آن‌ها نیز به نوبه خود پیوند کوالانسی با DNA ایجاد می‌کنند (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). به همین دلیل بیشتر PAHها اگر وارد بدن پستانداران شوند، همانند مواد سرطان‌زا عمل می‌کنند (گوئرین، ۱۹۹۹؛ بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). در لیست آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده شانزده PAH در الویت فهرست آلاینده‌ها قرار دارند (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱).

۶-۴- گیاهان و گیاه‌پالایی

بودن رایزوسفر گیاهان در خاک‌های آلوده به هیدروکربن افزایش شمار میکروب‌ها و بالا رفتن فعالیت متابولیک در خاک را تسهیل می‌کند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که طول ریشه، سطح ویژه، حجم و قطر در اثر توان‌بخشی گیاهان در پالایش خاک آلوده به نفت خام نقش دارد (مرکل و همکاران، ۲۰۰۵). ریشه‌ها همچنین می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاکی که دچار تنش

1. Alicyclic compounds
2. Cytochrome P-450
3. Epoxide hydrolase
4. Fjord- and bay-region diol-epoxides

آلودگی شـده اسـت را بهبود بخشـند و همین‌طور سـبب افزایش تماس بین میکروب‌های مرتبط با ریشه گیاهان و آلاینده‌ها در خاک شوند (آپریل و همکاران، ۱۹۹۰). این پیامد برای اولین بار توسط هیلتنر (۱۹۰۴) بیان شد که رایزوسفر را به عنوان ناحیه‌ای از خاک که در آن میکروب‌ها تحت تاثیر سـیسـتم ریشـه‌ای گیاهان قرار می‌گیرند و در آن موجودات خاک روی گیاهان تاثیر دارند، توصیف کرد. میکروب‌های جدا شـده از رایزوسـفر می‌توانند پیامد افزاینده یا بازدارنده رشـد بر ریشه داشته بـاشـند (کویپر و همکاران، ۲۰۰۴). مطالعه گونه‌های گیاهی درگیر در گیاه‌پالایی نشـان داده که گونه‌های علفی مختلف و گیاهان لگوم برای پالایش زیسـتی مناسـب هسـتند. مشـخص شـده که باکتری‌های میله‌ای گرم-منفی مانند گونه‌های *سودوموناس* در رایزوسفر غالب‌اند (کویپر و همکاران، ۲۰۰۴). در پـالایش و توان‌بخشـی خاک‌های آلوده به هیدروکربن با روش گیاه‌پالایی موفقیت‌هایی حاصـل شـده اسـت که به صورت استفاده از گیاه برای حذف، تخریب یا اندوختن (در بافت گیاهی) مواد خطرناک از محیط تعریف می‌شـود (گلیک، ۲۰۰۳). پالایش جایگاه‌های آلوده به هیدروکربن با کشت گیاهان تقویت شده است (مرکل و همکاران، ۲۰۰۵).

گیاهان می‌توانند سـطوح هیدروکربن در خاک را پایین بیاورند. اگرچه سـازوکار این اتفاق هنوز به طور کامل معلوم نیسـت. گیاه‌پالایی وابسـتگی زیادی به تحریک میکروب‌های رایزوسـفر توسـط ریشـه گیاهان دارد (تسار و همکاران، ۲۰۰۲). اما رابطه جذب هیدروکربن‌ها با ویژگی چربی‌دوستی آن‌ها که بر عبور آن‌ها از غشای یاخته تاثیر دارد، مورد سوال است. به نظر می‌رسد این نوع جذب با افزایش فعالیت میکروبی در خاک‌های آلوده نسـبتی داشـته باشـد که با افزایش شمار میکروب‌های تجزیه‌کننده در گیاه‌پالایی تایید شـده اسـت (وونشـه و همکاران، ۱۹۹۵؛ سـیسـیلیانو و همکاران، ۲۰۰۳). ایزومرهای BTEX بیشـترین تمایل به حذف از محیط توسـط میکروب‌های بومی خاک را دارند، اگرچه سـیسـتم اکولوژیک طبیعی می‌تواند مانع تجزیه آن‌ها شـود (کوایزومی و همکاران، ۲۰۰۲). بیشـتر محیط‌های آلوده بی‌هوازی هسـتند و چون فرایند تجزیه هیدروکربن‌ها در شـرایط هوازی تندتر از شـرایط بی‌هوازی اسـت، پس حذف آن‌ها در محیط‌های آلوده کارایی کمتری دارد. (کوایزومی و همکاران، ۲۰۰۲). انواعی از گونه‌های علفی، لگوم‌ها و درختان در حال رشـد سـریع مانند صـنوبر[1]، توسـکا[2] و بید[3] که شدت تعریق بالایی دارند در گیاه‌پالایی به کار رفته‌اند (جوردال و همکاران، ۱۹۹۷). این گیاهان سـیسـتم ریشـه‌ای وسیع دارند که سطح ویژه ریشه‌ای گسترده برای تماس با خاک ایجاد می‌کند. مرکل و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که در گیاهان جنس *براچیاریا*[4]،

1. Poplar
2. Alder
3. Willow
4. *Brachiaria*

سیپروس[1] و *الوسینه*[2] سطح ویژه بالای ریشه، وابستگی نسبی به سطح تجزیه هیدروکربن نفتی داشته است. ریشه گیاهان جایگاه اتصال برای میکروب‌ها بوده و منبع تولید عناصر غذایی هستند که بیشتر اسیدهای آلی شامل اسید آمینه‌ها و همین‌طور قندها و هیدروکربن‌های پیچیده در شکل تراوش‌های ریشه‌ای هستند (مهمان‌نواز و همکاران، ۲۰۰۲؛ تسار و همکاران، ۲۰۰۲). به عنوان نمونه، جوردال و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که شمار میکروب‌های تجزیه کننده بنزن، تولوئن و زایلن در رایزوسفر درختان صنوبر پنج برابر بیشتر از خاک مجاور بود. پالایش ریشه‌ای موفق توسط گیاهان به عواملی مانند متابولیت‌های اولیه و ثانویه، تشکیل کلنی، زنده‌مانی و برهم‌کنش اکولوژیک با دیگر موجودات وابسته است. افزون بر این، موسیژل ترشح شده توسط یاخته‌های ریشه، یاخته‌های مرده کلاهک ریشه، گرسنگی یاخته‌های ریشه و تجزیه کامل بافت ریشه هم مواد مغذی را فراهم می‌کند (ریلی و همکاران، ۱۹۹۶). بنابراین، از ریشه گیاهان به عنوان خیش برای برهم زدن خاک و مخلوط کردن مواد افزاینده به خاک و بهبود تهویه به عنوان روش پالایش یاد می‌شود (کوپیر و همکاران، ۲۰۰۴). گروه فیلوژنتیکی وسیعی از باکتری‌ها شامل جنس‌های *اکروموباکتر*[3]، *اسیدووراکس*[4]، *آلکالیجنز*، *آرتروباکتر*، *باسیلوس*، *کورینه باکتریوم*، *فلاووباکتریوم*[5]، *میکروکوکوس*[6]، *مایکوباکتریوم*، *نوکاردیا*، *سودوموناس*، *رودوکوکوس*، *اسفینگوموناس*[7]، و *زانتوموناس* در تجزیه هیدروکربن‌ها درگیر هستند (تسار و همکاران، ۲۰۰۲).

جامعه میکروبی خاک به شیوه‌های گوناگون مانند تراوش ترکیب‌های آلی و رقابت برای عناصر غذایی و سطوح برای چسبیدن تحت تاثیر ریشه گیاهان قرار می‌گیرند. کوپیر و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که رایزوسفر *سیپروس اسکولنتوس*[8]، *الوسینه کوراکانا*[9] و *برانتا سراشیا*[10] سبب تسهیل زندگی دامنه گسترده‌ای از باکتری‌ها می‌شود که احتمالاً به سبب توان آن‌ها در نگه‌داری شمار زیاد میکروب‌ها در ریشه‌های به شدت منشعب شده‌ی این گیاهان است. گیاهانی که سیستم ریشه‌ای گسترده دارند سطوح ویژه‌ی زیادی برای چسبیدن میکروب‌ها ایجاد می‌کنند (تسار و همکاران، ۲۰۰۲). گیاهان با تراوش مواد به رایزوسفر پیرامون بر pH خاک، نمناکی و مقدار اکسیژن تاثیر می‌گذارند (شروث و هیلدربراند، ۱۹۶۴). در بیشتر گیاهان عالی تراوش ریشه‌ای دیده می‌شود

1. *Cyperus*
2. *Eleusine*
3. *Achromobacter*
4. *Acidovorax*
5. *Flavobacterium*
6. *Micrococcus*
7. *Sphingomonas*
8. *Cyperus esculentus* L.
9. *Eleusine coracana* (L.) Geartn.
10. *Brantha serratia* L.

و روشن شده که این تراوش‌ها بر محیط زیستی و غیرزیستی رایزوسفر تاثیر دارند (شروث و هیلدربراند، ۱۹۶۴). پژوهش‌هایی که درباره‌ی ویژگی‌های باکتری‌های کشت‌شدنی رایزوسفر انجام شده نشان داد که گیاهان پیامدهای ویژه‌ای روی جوامع باکتریایی دارند. به هر حال این باکتری‌ها جزء کوچکی از باکتری‌های خاک هستند (دوینولد و همکاران، ۲۰۰۱).

۶-۵- تجزیه زیستی

ریزجانداران بومی خاک یعنی باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه PAHها در خاک هستند و سبب پاک‌شدن و احیای خاک‌ها می‌شوند. پالایش زیستی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها با استفاده از میکروب‌ها برای سمیت‌زدایی و احیا یک تیمار محیطی کارآمد، اقتصادی و چندجانبه است. میکروب‌های تجزیه کننده PAH در زیست‌بوم‌هایی که در آن آلاینده‌ها می‌توانند به عنوان منبع کربن باشند، فراگیر هستند و به نظر می‌رسد پس از رخ‌دادن آلودگی به سرعت مستقر شوند (مارگسین و همکاران، ۲۰۰۰). بازسازی و پاک‌سازی زمین‌های آلوده، امکان آلودگی آب‌های زیرزمینی را کم می‌کند و سرعت تجزیه زیستی را بالا می‌برد (گیبسون و پارالز، ۲۰۰۰؛ میشرا و همکاران، ۲۰۰۱). دیده شده که باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها در همه جای محیط‌های طبیعی دست‌نخورده حضور دارند. برای نمونه وونشه و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که جمعیت پایه باکتری‌های استفاده کننده از هیدروکربن‌ها ۳/۶ درصد بوده که با افزودن آلاینده‌های هیدروکربنی افزایش یافته است. بنابراین، تجزیه طبیعی آلاینده‌ها در جایگاه‌های کم خطرِ آلوده به مواد نفتی یک روش احیا و بازسازی کم‌هزینه در مقایسه با روش‌های پاک‌سازی مرسوم است (گیبسون و پارالز، ۲۰۰۰؛ مارگسین و شاینر، ۲۰۰۱). همچنین دیده شده که میکروب‌ها از ترکیب‌های BTEX به عنوان دهنده‌ی الکترون در متابولیسم خود استفاده می‌کنند و از این راه پالایش آلودگی در جایگاه‌های تحت تاثیر را تسهیل می‌کنند (استیفن و همکاران، ۱۹۹۹). در همین راستا، وونشه و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که الگوی استفاده از سوبسترا در سامانه زیستی با افزودن هیدروکربن‌ها تغییر یافته و جامعه باکتریایی اولیه خاک به سمت غالب شدن جمعیت *سودوموناس*ها که توان تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند تغییر یافت. این موضوع نشان دهنده پتانسیل سازگاری طبیعی به پالایش زیستی است. همین‌طور مایلا و همکاران (۲۰۰۵b) با استفاده از ترکیب روش‌های زیستی و مولکولی دریافتند که حذف آلودگی با جوامع میکروبی بومی در سطوح مختلف خاک، شامل ۴۸ درصد در خاک سطحی، ۳۱ درصد در عمق یک متری و ۱۱ درصد در عمق ۱/۵ متری بود. بنابراین روشن شد که PAHها و فنول‌ها در شرایط مناسب قابلیت تجزیه زیستی دارند (گوئرین، ۱۹۹۹). اگر چه، ساده‌ترین هیدروکربن‌های تجزیه شونده، اِن-آلکان‌ها با جرم مولکولی نسبی تا $n\text{-}C_{44}$ هستند (اتلس، ۱۹۸۱). تجزیه زیستی این ترکیب با حمله به انتهای

آن شـــروع شـــده و در نتیجه آن الکل نوع اول، یک آلدهید و یک مونوکربوکســـیلیک اســـید ایجاد می‌شـود. تجزیه بیشتر از مسیر بتا-اکسیداسیون سبب ایجاد دو واحد کربنی، اسیدهای چرب کوتاه یا کوتاه‌تر، اســـتیل کوآنزیم آ و دی‌اکســـید کربن می‌شـــود (اتلس، ۱۹۸۱). چندین باکتری گوناگون شناسایی شده‌اند که قادر به کاتابولیز PAH دو تا چهار حلقه‌ای به عنوان تنها منبع کربن هستند و بنابراین بهترین کاندیدا برای کاربرد در پالایش مکانی به شـــمار می‌روند (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). در این موارد، کاتابولیســـم با اســـتفاده از دی‌اکســـیژناز هیدروکربن‌های آروماتیک در سیستم آنزیمی چندجزئی انجام می‌شـود (سـامانتا و همکاران، ۲۰۰۲). دی‌اکســـیژنی که به هسته آروماتیک PAH موردنظر افزوده می‌شود به صورت زیر یک آرِن-سیس-دیول ایجاد می‌کند:

فرض شـــده که مهندســـی متابولیک ســـبب افزایش گنجایش میکروب‌ها در تجزیه ترکیب‌های سمی شود (سامانتا و همکاران، ۲۰۰۲). با این حال می‌توان با بهینه کردن دسترسی زیستی، جذب سـطحی و انتقال جرم، کارآمدی میکروب‌های طبیعی را که می‌توانند این متابولیســـم را انجام دهند افزایش داد (شـــکـل ۶-۱). ویدادا و همکاران (۲۰۰۲) نوزده گونه باکتریایی تجزیه کننده PAH از نمونـه‌هـای محیطی کویت، اندونزی، تایلند و ژاپن جدا کردند که متعلق به جنس‌های *رَلســـتونیا*[1]، *اســـفینگوموناس*، *بورکهولدریا*[2]، ســـودوموناس، *کوماموناس*[3]، *فلاووباکتریوم* و *باســـیلوس* بودند. به محیط‌های غنی شـده از این نمونه‌ها نفتالن و فنانترن به عنوان تنها منبع کربن افزوده شـده و چند فنوتیپ با توان متابولیســـم تجزیه‌ای و کاربرد گوناگون مشـــاهده شـــدند. تســـار و همکاران (۲۰۰۲) شـماری از جنس‌های باکتریایی که قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها باشـند را لیست کرده‌اند که شامل *آکروموبـاکتر*، *اســـیـدووراکس*، *آلکالیجنز*، *آرتروباکتر*، *باســـیلوس*، *کورینه باکتریوم*، *فلاووباکتریوم*، *میکروکوکوس*، *مایکوباکتریوم*، *نوکاردیا*، ســـودوموناس، *رودوکوکوس*، *اســـفینگوموناس* و *زانتوموناس* هســـتند. افزون بر این ریس و همکاران (۲۰۰۳) باکتری‌های خاصی پیدا کرده‌اند که قادر به پالایش زیســـتی گازوئیل در خاک‌های با شـوری بالا هستند. باکتری‌هایی از جنس *سلولوموناس*[4]، *باسیلوس*، *دیتزیا*[5] و *هالوموناس*[6] در خاک‌های با شـوری بیش از ۱۵٪ توانستند خاک را بازسازی کنند (ریس و همکاران ۲۰۰۳). کلین‌اســـتیوبر و همکاران (۲۰۰۶) تعیین کردند که شوری بر باکتری‌های غالب در خـاک‌هـای آلوده بـه گـازوئیـل بـه روش‌های متفاوت تاثیر می‌گذارد. شـــوری کم ســـبب چیرگی *اسـفینگوموناس*، شـوری بالا *رَلسـتونیا*، و شـوری بسـیار بالا سـبب چیرگی جنس‌های نمک‌دوست

1. *Ralstonia*
2. *Burkholderia*
3. *Comamonas*
4. *Cellulomonas*
5. *Dietzia*
6. *Halomonas*

هـالوموناس، *دیتزیا* و *آلکانیوراکس* شـــدند. برخی باکتری‌ها به عنوان تجزیه کننده PAH خاص در محیط کشـت توصـیف شـده‌اند. برای نمونه ویلیسـون (۲۰۰۴) گونه‌ای از *اسـفینگوموناس* به نام CHY-1 را معرفی کرد که قادر به تجزیه کرایسِن به عنوان تنها منبع کربن در محیط کشت بود. از دیگر نمونه‌ها که به طور ویژه‌ای کار می‌کنند می‌توان اعضای جنس *پرویدنسیا*[1] را نام برد که قادر به تجزیه کامل هگزاهیدرو-۱، ۳، ۵-تری‌نیترو-۱، ۳، ۵-تریازین (RDX) و نیتروزو-RDX بوده و برای همین هدف در پالایش زیستی استفاده شده‌اند (کیتس و همکاران، ۱۹۹۴).

قارچ‌های مایکوریز بیرونی و درونی از منظر همزیســـتی با ریشـــه گیاهان فراگیر و همه جایی هســـتنـد (لینـدرمن ۱۹۸۸). این قـارچ‌های اندوفیتی به ویژه مایکوریز بیرونی گیاهان را در جذب عناصـر از خاک، به ویژه عناصـر ناپویایی مانند روی، مس، گوگرد، کلسـیم، پتاسـیم، آهن، منیزیم، منگنز، کلر، بور و نیتروژن یاری می‌رسـانند. جذب فسـفر هم توسـط هر دو نوع مایکوریز بیرونی و درونی تقویت می‌شود (لیندرمن، ۱۹۸۸). گزارش شده که قارچ‌های مایکوریز در پاسخ دادن گیاه به ســایر تنش‌ها مانند ســطوح بالای نمک و ترکیب‌های ســمی مرتبط با آلودگی معادن، لندفیل‌ها، عناصر سنگین و دیگر عناصر میکروبی سمی تاثیر دارند (لیندرمن، ۱۹۸۸).

زیسـت‌پالایی به دلیل تجزیه زیسـتی در ابتدا به غلبه بر هرگونه کمبود عناصر غذایی در خاکی که باید اصـلاح شود، وابسته است. اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن معمولاً با مقدار کربن آزاد، فسـفر و یا نیتروژن موجود محدود می‌شـود (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱؛ مارگسـین و شاینر، ۲۰۰۱، رولینـگ و همکـاران، ۲۰۰۲). بـه هر روی، اســـتروترز و همکـاران (۱۹۹۸) دریافتند که علف‌کش آترازین[2] در خـاک، توســـط *اگروبـاکتریوم رادیوبـاکتر* بـدون افزایش کربن یـا نیتروژن مازاد تجزیه می‌شـود. البته شـمار باکتری مایه‌زنی شـده افزایش نیافت که این موضـوع نشان دهنده زنده ماندن باکتری و عدم رشـد آن اسـت. شـمار جمعیت میکروبی را می‌توان با تزریق عناصـر محلول در زیر سـطح خاک افزایش داد. البته این کار ممکن اسـت در جایی‌که تزریق صـورت گرفته سبب متمرکز شـدن رشد میکروبی و "رسوب زیستی[3]" شود (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). دیده شده که استفاده از فرم گازی عناصـر غذایی توزیع بهتری در سـیسـتم داشـته و برای پالایش زیسـتی مفید بوده است (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). فراهم کردن عناصـر به ویژه نیتروژن و فسـفر به صـورت کودهای این عناصـر سـبب افزایش تجزیه زیستی نفت رها شده در پهنه‌های آبی شده است (کاسای و همکاران، ۲۰۰۲). با این حال افزودن اصـلاح کننده‌ها برای جبران کمبود باید بهینه باشند. چراکه مقدار زیاد آن‌ها سـبب یوتریفیکاسـیون آب‌ها شـده و مقدار خیلی کمِ آن‌ها نیز منجر به تجزیه زیسـتی کمتر

1. *Providencia*
2. Atrazine
3. Biofouling

خواهد شد (رولینگ و همکاران، ۲۰۰۲). تری‌اتیل فسفات (TEP) و تری‌بوتیل فسفات (TBP) ترکیب‌های فسفر مناسب هستند که به سادگی در خاکی که دارای کمبود (فسفر) باشد به حالت گازی درمی‌آیند. برای رفع کمبود نیتروژن هم از نیترو اکسید استفاده شده است (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). اگرچه افزودن عناصر غذایی در شکل گازی سبب بهبود پالایش خاک آلوده به PAH نشد اما سبب تسریع پالایش خاک‌های آلوده به حلال‌های کلردار، ترکیب‌های آلی فرار، آلکان‌های ۴ تا ۱۰ کربنی و هیدروکربن‌های تک‌حلقه‌ای شد (بوگان و همکاران، ۲۰۰۱). لی و همکاران (۲۰۰۳) دریافتند که افزایش مقدار بهینه پیرووات به عنوان منبع دیگر کربن به خاک آلوده به PAH به تجزیه آن (نفتالن در آزمایش آن‌ها) کمک می‌کند. آن‌ها غلظت بهینه منبع کربن برای تجزیه کامل نفتالن توسط *سودوموناس پوتیدا* G7 را تعیین کردند.

برای مایه‌زنی میکروب‌ها به خاک آلوده می‌توان از حاملین مختلف استفاده کرد. فرآورده‌های کشاورزی از معمول‌ترین این حامل‌ها برای انتقال میکروب‌ها بدون تاثیر بر گنجایش تجزیه‌کنندگی آن‌ها هستند (میشرا و همکاران، ۲۰۰۱). در این زمینه شدت و سرعت تجزیه آلاینده با فاکتورهای محیطی مانند جامعه میکروبی بومی خاک، فراهمی عناصر غذایی، سطح اکسیژن، pH، دما، نمناکی، کمیت، کیفیت و فراهمی زیستی آلاینده و ویژگی‌های خاک کنترل می‌شود (مارگسین و همکاران، ۲۰۰۰). اگرچه زیست‌پالایی اولین ساز و کار حذف آلاینده‌های خاک است، سایر فرایندها مانند انتشار، رقیق‌سازی، جذب، گازی کردن و تغییر شکل غیرزیستی هم در فرایندهای بازسازی و احیا به کار می‌روند (مارگسین و شاینر، ۲۰۰۱).

۶-۶- رایزوسفر

رایزوسفر نیچی[1] است که جوامع میکروبی بومی خاک که در چرخه عناصر غذایی هستند را در خود جای می‌دهد. همین‌طور نقش حیاتی در زنده‌مانی گیاه در شرایط نامناسب شیمیایی خاک ایفا می‌کند (ایزاگوئیره-مایورال و همکاران، ۲۰۰۲). گیاه‌پالایی از فن‌آوری رایزوسفر در افزایش پالایش زیستی استفاده می‌کند. سلامت گیاه با ترغیب تولید هورمون‌های گیاهی، تامین مواد غذایی، تثبیت نیتروژن و سرکوب میکروب‌های مضر برای گیاه از راه آنتاگونیسم تحت تاثیر قرار می‌گیرد (داسیلوا و همکاران، ۲۰۰۳). سیسلیانو و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که سیستم‌های گیاه‌پالایی TPH کارآمد سبب ترغیب افزایش شمار باکتری‌های دارای ژن‌های متابولیسم کننده هیدروکربن می‌شود. PAHها ممکن است با تصعید، اکسیداسیون نوری، جذب و آب‌شویی حذف شوند که در حضور گیاهان این فرایندها تقویت می‌شوند (جونر و همکاران، ۲۰۰۲).

1. Niche

۶-۶-۱- تراوش‌های ریشه‌ای

خاک رایزوسفر با توجه به pH، O_2، CO_2 و فراهمی عناصر غذایی تغییر می‌کند. گیاهان مواد ساده تجزیه شونده‌ای را به خاک تراوش می‌کنند که سبب افزایش فعالیت میکروبی در رایزوسفر می‌شوند (شروث و هیلدبراند، ۱۹۶۴؛ جونر و همکاران، ۲۰۰۲). این مواد از راه گازی شدن، شست و شو، تراوش یا تجزیه رها می‌شوند و می‌توانند بر رشد موجوداتی در خاک که نزدیک گیاهان هستند تاثیر گذارند (میسنر و همکاران، ۱۹۸۶). ترکیب دقیق تراوش‌های ریشه‌ای در خاک به طور کامل شناسایی نشده است که عمدتاً به دلیل پوست انداختن و اتولیز[1] یاخته‌های اپیدرمی است که به گونه پیوسته بر محیط تاثیر می‌گذارند (شروث و اسنایدر، ۱۹۶۱). در هر حال سه جنبه از ویژگی‌های اصلاح شده‌ی خاک در رایزوسفر در گیاه‌پالایی آلاینده‌های آلی موثر است که شامل فعالیت بالای میکروبی، پتانسیل اکسیداسیون بالا و جامعه میکروبی تغییر یافته است (جونر و همکاران، ۲۰۰۲). ترکیب‌های ثانویه تراوش‌ها که در خاک رایزوسفری یافت می‌شوند شامل پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند. برخی از این ترکیب‌ها رشد میکروبی را سرکوب کرده و برخی دیگر آن‌را تقویت می‌کنند (دآرسی لامتا و جی، ۱۹۸۷). بنابراین، جامعه میکروبی در رایزوسفر تحت تاثیر نوع تراوش ریشه‌ای تولید شده توسط گیاه قرار می‌گیرد. همانند توان باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH، ریشه گیاهان نیز دارای آنزیم‌های اکسیداتیو محلول و چسبیده به دیواره یاخته‌ای هستند که به طور مستقیم در تجزیه PAH نقش دارند (جونر و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، سیستم گیاه‌پالایی که شامل گیاه و جامعه میکروبی رایزوسفر است می‌تواند به عنوان ابزاری برای افزایش پتانسیل تجزیه هیدروکربن‌ها به کار رود. اما کوددهی و تقویت عناصر غذایی برای به دست آوردن نتیجه خوب، مورد نیاز است (سیسیلیانو و همکاران، ۲۰۰۳).

۶-۶-۲- جوامع میکروبی

مفهوم «جمعیت» یک واژه مهم و مرکزی در زیست‌بوم، زیست‌شناسی تکامل و زیست‌شناسی حفاظت است. کربس (۱۹۹۴) جمعیت را این گونه تعریف می‌کند: گروهی از موجوداتِ یک گونه مشابه یا یکسان که در زمان خاص مکان خاصی را اشغال می‌کنند. واپلز و گاگیاتی (۲۰۰۶) اخیراً مفهوم جمعیت را در بستر پارادایم تکامل و زیست‌بوم بررسی کرده و چند معیار و شاخص را پیشنهاد کرده‌اند که با آن بشود تعیین کرد «تا کجا یک گروه از افراد می‌توانند متفاوت باشند که به آن‌ها جمعیت مجزا یا جداگانه بگوییم». جمعیت طبیعی تنها با دو مرز ژنتیک و بوم‌شناسی محدود می‌شود. یعنی این‌که در درون یک جمعیت افراد از راه تولید مثل و بوم‌شناسی باهم برهم‌کنش

1. Autolysis

دارند. بر اساس این برهم‌کنش‌ها، واپلز و گاگیاتی (۲۰۰۶) به این نتیجه رسیدند که اگر تبادل ژن در جامعه کم یا متوسط باشد، یک گروه از افراد بدون استفاده از اطلاعات نمونه‌برداری مکانی می‌توانند بیانگر یک جامعه واقعی باشند. بنابراین، در این فصل، مطالعه تعداد زیادی از گونه‌های مختلف که باهم در یک محیط برهم‌کنش دارند، به عنوان مطالعه یک اجتماع یا جامعه در نظر گرفته خواهد شد. پس به دلیل جریان ژنی بین افراد در یک اجتماع، پیشرفت‌های اخیر در نشان‌گرهای DNA سبب علاقه‌مندی زیاد در مطالعه ژنتیکی جوامع طبیعی شده است.

جامعه میکروبی خاک توزیع نسبی یکنواخت در محیط غیرآلوده دارد. با این حال اسمالا و همکاران (۲۰۰۱) ثابت کردند که در رایزوسفر در مقایسه با خاک کشت نشده یکنواختی کمتری وجود دارد. ژو و همکاران (۲۰۰۲) جوامع میکروبی را در ۲۹ نوع خاک مختلف بررسی کردند. آن‌ها دیدند که در خاک با کربن کمتر الگوی تنوع در لایه سطحی خاک توزیع یکنواخت داشت در حالی‌که در لایه زیرین خاک چنین نبود. در مقابل، در خاک‌های با کربن بالا در لایه‌های رویی و زیرین تنوع یکنواختی دیده شد که نشان می‌دهد اگر کربن خاک بالا باشد، تفاوت در مکان نمونه‌برداری از بین خواهد رفت. فرض کلی بر این است که تنوع بالای میکروبی متناسب با پتانسیل افزایش متابولیسم است (دی‌یونگه و همکاران، ۲۰۰۱). در عمل می‌توان چنین گفت که تنوع بالای گونه‌ای سبب حذف متابولیت‌ها و آلاینده‌ها از یک سوبسترا است. به افزایش گنجایش برداشت زیستی آلاینده‌ها از خاک با مایه‌زنی سویه خاص یا مجموعه‌ای از میکروب‌ها تقویت زیستی گفته می‌شود (هالدن و همکاران، ۱۹۹۹؛ دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱). فراوانی با غنای یک گونه در اجتماع و چگونگی توزیع[1] آن (یکنواختی[2] توزیع در اجتماع) دو جزء تنوع یک گونه در محیط هستند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱). برای ترغیب و افزایش پتانسیل تجزیه کنندگی جامعه میکروبی، شایستگی و صلاحیت یک واکنش خاص در شرایط آن مورد نیاز است که در عمل نشان می‌دهد که نیاز است ژن‌های یک سیستم فعال شوند تا در جریان انرژی در محیط نقش داشته باشند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱).

۶-۶-۳- ارزیابی غنا و تنوع یک گونه

چندین روش برای بررسی غنا و تنوع یک گونه در یک محیط وجود دارد که روش‌های مختلف کشت روی پتری، میکروسکوپ نوری و فلورسنت و آنالیز DNA و RNA از آن جمله هستند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱؛ دواینِولد و همکاران، ۲۰۰۱؛ تورسویک و اُورراس، ۲۰۰۲). در مطالعه تنوع میکروبی چند محدودیت کلی وجود دارد که بایستی در نظر گرفته شود. ناهمگنی مکانی

1. Distribution
2. Equitability

بایســـتی مورد توجه قرار گیرد زیرا بیشـــتر نمونه‌های محیطی ۱ تا ۵ گرم از مواد نمونه را شـــامل می‌شـوند که نمی‌تواند نماینده مناسبی از توزیع مکانی موجودات باشد (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴). کشـت واحدهای سـازنده کلنی (CFUs) روی محیط کشـت‌های مختلف روش مرسـوم برای تنوع میکروبی نیسـت. ضمن این‌که کشت بسیاری از نمونه‌های میکروبی که بایستی از محیط جدا شوند به دلیل شرایط محیط کشت امکان‌پذیر نیست (سکیگوچی و همکاران، ۲۰۰۲). روش‌های مبتنی بر کشـت پرزحمت است و گونه‌هایی مانند *مایکوباکتریوم*ها زمان زیادی طول می‌کشد تا رشد کنند. با توجه به انتخابی بودن محیط‌های کشـــت و شـــرایط تنها ۱ تا ۱۰ درصـــد باکتری‌های عمومی قابل کشـــت هســـتند (مک‌ســـیاگ و همکاران، ۱۹۹۹؛ وان وینتزینگروده و همکاران، ۲۰۰۲؛ کیرک و همکاران، ۲۰۰۴). کمتر از یک درصـد میکروب‌های خاک در محیط‌های آلوده قابل کشـت هسـتند (اسـتیفن و همکاران، ۱۹۹۹). آنالیز تنفس یاخته‌های مجزا در نمونه‌های خاک نشان داده که شمار باکتری‌های فعال از نظر متابولیکی بســـیار بیشـــتر از باکتری‌های قابل کشـــت در محیط کشـــت آزمایشـگاهی هسـتند (مک‌سـیاگ و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین هر دو روش کشـت آزمایشـگاهی و میکروســـکوپی در تشـــخیص کـامـل جوامع گونـاگون بـاکتریایی و ارزیابی تنوع آن‌ها نقص دارند (دواِینولِد و همکاران، ۲۰۰۱). افزون بر این، میکروبی که در یک محیط کشـــت مصـــنوعی رشـــد می‌کند موادی تولید می‌کند که این مواد می‌تواند رشـــد میکروب‌های دیگر را افزایش داده یا جلوی رشـد آن‌ها را بگیرد. این مواد در خاک پیامد چندانی ندارند چون ممکن اسـت به دلیل pH، جذب سـطحی روی رس‌ها و مصـرف شدن توسط میکروب‌ها بی‌اثر شوند که همه این شرایط در رایزوسفر برقرار است (شروث و هیلدربراند، ۱۹۶۴).

روش‌های مولکولی دیدگاه دقیقی از ســـرشـــاری گونه‌ها در تنوع فراهم کرده‌اند. در مرحله اول، قطعات تصـادفی از DNA ژنومی در محیط کلون شـده و آن‌هایی که دارای ژن rRNA بودند برای توالی‌یابی انتخاب شـدند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱). پیشـرفت بعدی در آنالیز مولکولی وقتی انجام شـــد که از PCR برای تکثیر گزینشـــی این قطعات ژن‌های rRNA از کل DNA جامعه میکروبی اســـتفاده شـــد که در آن آغازگرهای مختلف برای تکثیر این ژن‌ها از همه انواع موجودات (آرکی‌ها، باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها) به کار رفتند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱؛ تورسویک و اُوِراس، ۲۰۰۲). آهن و همکـاران (۱۹۹۹) DNA را برای متـابولیســـم نفتالن و دیگر PAH ها در خاک آلوده به PAH کاوش کردند. آن‌ها با اسـتفاده از پروب nahA دریافتند که بیشتر باکتری‌های تجزیه کننده PAH دارای ژنوتیپ شـبه-NAH7 بودند و همین‌طور دیدند که تنها ۱۵ درصـد با این پروب شـناسـایی نشـدند. بنابراین برای شمارش و تعیین تجزیه کنندگان PAH پروب‌های جدیدی پیشنهاد شد. گام بعدی در این فناوری این بود که قطعات PCR مرکب (مخلوط) بتوانند کلون شده و توالی‌یابی شوند یا با روش‌های ردیابی مختلف مانند DGGE بررســی شــوند (دیونگه و همکاران، ۲۰۰۱؛ دواِینولِد و

همکاران، ۲۰۰۱). به هر حال، این روش‌ها هم تنها زمانی کارآمد هستند که روش‌های اولیه یعنی تجزیه یاخته‌ای کارآمد، استخراج DNA مجزا، تکثیر PCR نااُریب و آنالیز پایین‌دستی کارآمد انجام شده باشد (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴).

۶-۶-۴- پالایش

چندین روش برای تعیین سطح پالایش در خاک‌های آلوده وجود دارد. می‌توان با پایش سمیت در یک موجود آزمایشی برای فرآورده یا تغییر به غربال‌گری ناپدید شدن آلاینده دسترسی پیدا کرد و سمیت را پایش نمود. از قدیم از گونه‌هایی مانند *سریودافنیا*[1] (سخت‌پوستی از خانواده دافنیده[2]) و *پیمفالس پروملاس* رافینسک[3] (یک نوع ماهی از خانواده سایپرینیده[4] معروف به فادد مینو[5]) در آب و چند بی‌مهره در خاک برای پاسخ به سمیت استفاده می‌شد (وایت و همکاران، ۱۹۹۸). به هر حال آنالیز جوامع میکروبی ثابت کرده که شاخص بسیار جامع‌تری برای باقی‌مانده آلاینده است. از پایش برگشت جامعه به سطح پایه (پیش از آلودگی) برای دلالت بر برگشت جامعه میکروبی یک خاک به سطح نرمال استفاده شده است (وایت و همکاران، ۱۹۹۸). لی و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که شمار گونه‌های باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده به فلز سنگین با زمان و آلودگی بیشتر افزایش یافته و بنابراین می‌تواند شاخص سطح آلودگی به فلز سنگین و کیفیت خاک باشد.

میکروفلور رایزوسفر به دلیل اثر بافری زیستی و غیرزیستی زیست‌گاه به آسانی تغییر نمی‌کند (باهمه و همکاران، ۱۹۸۸). اما پژوهش‌ها نشان داده‌اند که با مایه‌زنی باکتری ریشه‌ای[6] خاص به ریشه گیاه می‌توان میکروفلور رایزوسفر را تغییر داد. گنجایش تغییر میکروفلور به چندین فاکتور مانند ماهیت سویه وارد شده، کارآمدی کلنیزاسیون و توان آن به پایدار ماندن روی سیستم ریشه در دراز مدت، وابسته است (باهمه و همکاران، ۱۹۸۸). اندازه مایه تلقیح و چگونگی انتقال آن بر پویایی جمعیت در خاک تاثیر می‌گذارد. یعنی این‌که تراکم جمعیت باتوجه به فاصله از نقطه مایه‌زنی کم می‌شود (باهمه و همکاران، ۱۹۸۸). دو نوع سیستم برای مایه‌زنی باکتری‌های ریشه به اندام‌های زیرزمینی گیاه توسط باهمه و همکاران (۱۹۸۸) توصیف شده است که یکی بذرهای آغشته به باکتری است که به طور مکانیکی پیش از کشت با خاک مخلوط می‌شوند و دیگری انتقال سویه باکتری مورد نظر با سیستم آبیاری قطره‌ای با فشار کم است.

---

1. *Ceriodaphnia*
2. Daphniidae
3. *Pimephales promelas* Rafinesque
4. Cyprinidae
5. Fathead minnow
6. Rhizobacteria

گونه‌های *بورکهولدریا* از رایزوسفر گیاه جدا شده‌اند و بنابراین نمونه خوبی برای پالایش ریشه‌ای هستند. اُسولیوان و ماهنتیرالینگام (۲۰۰۵) دریافتند که *بورکهولدریا* جنس غالب جدا شده از خاک‌های آلوده به PAH است. همچنین از انواع سویه‌های این باکتری شش سویه (CSV90، EML1549، K712، RASC، TFD2، TFD6) قادر به تجزیه ۲، ۴-دی‌کرو فنوکسی استات نیز بودند. *بورکهولدریا زنووُرانس*[1] سویه LB400 یک تجزیه کننده هوازی بی‌فنیل‌های چندکلری با استفاده از آنزیم بی‌فنیل-۲، ۳-دی‌اکسیژناز است. اگر همراه این گونه مالتوتریوز استر برای بالابردن حلالیت و افزایش فراهمی زیستی هم باشد، قادر است ترکیب‌های بی‌فنیل تا شش کلر را نیز تجزیه کند (اُسولیوان و ماهنتیرالینگام، ۲۰۰۵). *بورکهولدریا ویتنامینسیز*[2] سویه G4 قادر به کومتابولیزه کردن هم‌زمان تری‌کلرواتیلن (TCE) -که یک آلاینده آلی در آب‌خوان‌های زیرزمینی آلوده است- و تولوئن یا فنول با آنزیم تولوئن اُ-مونواکسیژناز است. سویه G4 زیاد مطالعه شده و 4925802 و5543317 دو شماره کاربرد انحصاری آن مربوط به ایالات متحده موجود است (اُسولیوان و ماهنتیرالینگام، ۲۰۰۵). سویه G4 به طور ترجیحی تولوئن را در محیط کشت تجزیه می‌کند و برای تجزیه بیشینه (۱۰۰ درصد) TCE بایستی همیشه تولوئن در محیط باشد. از آن‌جا که در احیای میدانی نمی‌شود تولوئن و فنول را به کار برد، سویه موتانت G4 یعنی PR1 که به ماده غذایی اضافی نیاز ندارد مهندسی شده است تا TCE را در چند هفته حذف کند. با این وجود، سویه G4 هنوز هم پالایش‌گر زیستی کارآمدتری است. ژن تولوئن-اُ-مونو-اکسیژناز از G4به *ایشریشیا کولای* برده شد تا شدت تجزیه TCE را با این باکتری افزایش دهند و گنجایش تجزیه PAH و همین‌طور نفتالن را بالا ببرند (اُسولیوان و ماهنتیرالینگام، ۲۰۰۵). تقویت زیستی خاک‌های ایستگاه‌های سوخت‌گیری که در آن‌ها بنزین، گازوئیل و همین‌طور نفت خام به زمین ریخته می‌شود با باکتری‌هایی از جنس‌های *میکروکوکوس*، *کورینه باکتریوم*، *فلاووباکتریوم*، *باسیلوس* و *سودوموناس* انجام شده است (رحمان و همکاران، ۲۰۰۲). اگر تخصصی‌تر بگوییم، پنتاکلروفنول با *فلاووباکتریوم* و *آرتروباکتر* تجزیه شده ولی افزودن *رودوکوکوس کلروفنولیکوس*[3] و *سودوموناس سپاسیا*[4] به ۲، ۴، ۵-تری کلروفنوکسی استیک اسید سبب تسریع حذف آن می‌شود (هالدن و همکاران، ۱۹۹۹). PAHهای نفتی در دریا با باکتری‌های جنس *سیکلوکلاستیکوس*[5] تجزیه زیستی شده است (کاسای و همکاران، ۲۰۰۲). داسیلوا و همکاران (۲۰۰۳a) دریافتند که شماری از گونه‌های *پینی‌باسیلوس* به دلیل توانایی تجزیه PAHها در کشاورزی مهم هستند.

---

1. *xenovorans*
2. *vietnamiensis*
3. *chlorophenolicus*
4. *cepacia*
5. *Cycloclasticus*

در پژوهش‌های اخیر تمرکز زیادی به استفاده از باکتری‌ها در پالایش زیستی شده است. اما قارچ‌ها هم می‌توانند نقش مهمی در این زمینه داشته باشند. درکل، قارچ‌ها در شرایط سخت بردبارتر از باکتری‌ها هستند و به خوبی می‌توانند در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاک وارد شوند (پرینافتا-بولدو و همکاران، ۲۰۰۲). داسیلوا و همکاران (۲۰۰۳b) قارچ‌های رشته‌ای را از رسوبات اقیانوس آرام در برزیل جدا کردند و توان این قارچ‌ها در تجزیه PAHها به ویژه پایرن در محیط کشت را بررسی کردند. آن‌ها دیدند که *سیکلوتایریوم*[1] کارآمدترین قارچ بوده و به ترتیب ۷۴، ۷۰، ۵۹ و ۳۸ درصد از پایرن، فنانترن، آنتراسن، و بنزو(a)پایرن را به صورت هم‌زمان تجزیه می‌کند. افزون بر این، دیده شده است که تولوئن، اتیل‌بنزن و زایلن هم با *کلادوفیالوفورا*[2] تجزیه می‌شوند (پرنافتا-بولدو و همکاران، ۲۰۰۲).

1. *Cyclothyrium*
2. *Cladophialophora*

منابع

Ahn Y, Sanseverino J, Sayler GS (1999) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from polluted soils. Biodegradation 10:149–157.

Aprill W, Sims RC, Sims JL, Matthews JE (1990) Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in polluted soil. Waste Manage Res 8: 45–65.

Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol Rev 45:180–209.

Bahme JB, Schroth MN, Van Gundy SD, Weinhold AR, Tolentino DM (1988) Effect of inocula delivery systems on rhizobacterial colonisation of underground organs of potato. Phytopathology 78:534–542.

Banks MK, Alleman J (2002) Microbial indicators of bioremediation potential and success.

Hazardous substance research centres. Georgia Tech Research Corporation. http://www.hsrc. Org/mw-microbial.html.

Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA (2003) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Appl Environ Microbiol 69:926–932.

Bogan BW, Lahner LM, Trbovic V, Szajkovics AM, Paterek JR (2001) Effects of alkylphosphates and nitrous oxide on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol 67:2139–2144.

D'Arcy Lameta A, Jay M (1987) Study of soybean and lentil root exudates. Plant Soil 101:267–272.

Da Silva M, Cerniglia CE, Pothuluri JV, Canhos VP, Esposito E (2003b) Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. World J Microbiol Biotechnol 19:399–405.

Deacon J (2004) The microbial world: the nitrogen cycle and nitrogen fixation. Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh. http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/nitrogen.htm.

Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM, Verstraete W (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness, missing links. Environ Microbiol 3:649–657.

Doran JW, Zeiss MR (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Appl Soil Ecol 15:3–11.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, Van Elsas JD, Van Veen JA (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of Chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 67:172–178.

Gibson DT, Parales RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology.Curr Opin Biotechnol 11:236–243.

Gillan DC (2004) The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in North Sea sediments as revealed by DGGE analysis — the importance of the protocol. Mar Pollut Bull 49:504–513.

Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Osborn AM, Ball AS (2003) Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. Appl Environ Microbiol 69:1800–1809.

Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnol Adv 21:383–393.

Gold T (1985) The origin of natural gas and petroleum, and the prognosis for future supplies. Annu Rev Energy 10:53–77.

Greer C, Masson L, Comeau Y, Brousseau R, Samson R (1993) Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant degrading bacteria. Can J Water Pollut Res 28:275–287.

Guerin TF (1999) Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote polluted soil using ex situ land treatment. J Hazard Mat B65:305–315.

Gussin GN, Ronson CW, Ausubel FM (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. Ann Rev Genet 20:567–591.

Halden RU, Tepp SM, Halden BG, Dwyer DF (1999) Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by Pseudomonas pseudoalcaligenes POB310(pPOB) and two modified Pseudomonas strains. Appl Environ Microbiol 65:3354–3359.

Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grunddüngung und Brache. Arb Deut Landw Gesell 98:59–78.

Izaguirre-Mayoral ML, Flores S, Carballo O (2002) Determination of acid phosphatase and dehydrogenase activities in the rhizosphere of

nodulated legume species native to two contrasting savanna sites in Venezuela. Biol Fertil Soils 35:470–472.

Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C (2002) Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. Soil Biol Biochem 34:859–864.

Jordahl JL, Foster L, Schnoor JL, Alvarez PJJ (1997) Effect of hybrid poplar trees on microbial communities important to hazardous waste bioremediation. Environ Toxicol Chem 16:1318–1321.

Kasai Y, Kishira H, Harayama S (2002) Bacteria belonging to the genus Cycloclasticus play a primary role in degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. Appl Environ Microbiol 68:5625–5633.

Kent AD, Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Ann Rev Microbiol 56:211–236.

Kitts CL, Cunningham DP, Unkefer PJ (1994) Isolation of three hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteriaceae from nitramine explosive polluted soil. Appl Environ Microbiol 60:4608–4611.

Kleinsteuber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S. (2006) Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. Appl Environ Microbiol 72:3531–3542.

Koizumi Y, Kelly JJ, Nakagawa T, Urakawa H, El-Fantroussi S, Al-Muzaini S, Fukui M, Urushigawa Y, Stahl DA (2002) Parallel characterisation of anaerobic toluene- and ethylbenzene degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA–DNA membrane hybridisation, and DNA microarray technology. Appl Environ Microbiol 68:3215–3225.

Kozdrój J, Van Elsas JD (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. J Microbiol Meth 43:197–212.

Krebs CJ (1994) Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. Harper Collins, New York.

Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg G, Lugtenberg BJJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction. Mol Plant Microbe Interact 17:6–15.

Lee K, Park JW, Ahn IS (2003) Effect of additional carbon source on naphthalene degradation by Pseudomonas putida G7. J Hazard Mater B105:157–167.

Lee SD, Kim ES, Hah YC (2000) Phylogenetic analysis of the genera Pseudonocardia and Actinobispora based on 16S ribosomal DNA sequences. Microbiol Lett 182:125–129.

Li Z, Xu J, Tang C, Wu J, Muhammad A, Wang H (2006) Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. Chemosphere 62:1374–1380.

Linderman RG (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. Phytopathology 78:366–371.

Lindstrom JE, Barry RP, Braddock JF (1999) Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. Soil Biol Biochem 31:1677–1689.

Maila MP, Randima P, Cloete TE (2005a) Multispecies and monoculture rhizoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the soil. J Phytoremed 7:87–98.

Maila MP, Randima P, Surridge AKJ, Drønen AK, Cloete TE (2005b) Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. Int J Biodeterior Biodegradation 55:39–44.

Margesin R, Schinner F (2001) Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of dieseloil polluted soil in an Alpine Glacier skiing area. Appl Environ Microbiol 67:3127–3133.

Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (2000) Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40:339–346.

McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. Appl Environ Microbiol 65:1721–1730

Mehmannavaz R, Prasher SO, Ahmad D (2002) Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a polluted soil augmented with Sinorhizobium meliloti. Process Biochem 37:955–963.

Meissner R, Nel PC, Beyers EA (1986) Allelopathic influence of Tagetes- and Bidens-infested soils on seedling growth of certain crop species. S Afr J Plant Soil 3:176–180.

Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C (2005) Phytoremediation in the tropics — influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. Environ Pollut 138:86–91.

Milcic-Terzic J, Lopez-Vidal Y, Vrvic MM, Saval S (2000) Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-polluted soil. Water Sci Technol 42: 403–406.

Milcic-Terzic J, Lopez-Vidal Y, Vrvic MM, Saval S (2001) Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-polluted soil. Bior Technol 78:47–54.

Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B (2001) Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-polluted soil. Appl Environ Microbiol 67:1675–1681.

Muyzer G, DeWaal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial communities by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700.

Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreas L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Am J Soil Sci 64:1382–1388.

O'Sullivan LA, Mahenthiralingam E (2005) Biotechnological potential within the genus Burkholderia. Lett Appl Microbiol 41:8–11.

Prenafeta-Boldú FX, Vervoort J, Grotenhuis JTC, Van Groenestijn JW (2002) Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus Cladophialophora sp. Strain T1. Appl Environ Microbiol 68:2660–2665.

Rahman KS, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM (2002) Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. J Basic Microbiol 42:284–291.

Reilley KA, Banks MK, Schab AP (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. J Environ Qual 25:212–219.

Riis V, Kleinsteuber S, Babel W (2003) Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. Can J Microbiol 49:713–721.

Röling WFM, Milner MG, Jones DM, Lee K, Daniel F, Swannell RJP, Head IM (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of

bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl Environ Microbiol 68:5537–5548.

Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, Van Elsas JD (1998) Genetic diversity of nifH gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. Appl Environ Microbiol 64:2770–2779.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycylic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol 20:243–248.

Schroth MN, Hildebrand DC (1964) Influence of plant exudates on root-infecting fungi. Annu Rev Phytopathol 2:101–132.

Schroth MN, Snyder WC (1961) Effect of host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus, Fusarium solani f. phaseoli. Phytopathology 51:389–393.

Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl Environ Microbiol 68:5142–5150.

Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW (2003) Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. Appl Environ Microbiol 69:483–489.

Simonet P, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P (1991) Frankia: a genus-specific characterisation by polymerase reaction. Appl Environ Microbiol 57:3278–3286.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Appl Environ Microbiol 67:4742–4751.

Stephen JR, Chang YJ, Gan YD, Peacock A, Pfiffner SM, Barcelona MJ, White DC, McNaughton SJ (1999) Microbial characterisation of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) – based approach. Environ Microbiol 1:231–241.

Struthers JK, Jayachandran K, Moorman TB (1998) Biodegradation of atrazine by Agrobacterium radiobacter J14a and use of this strain

in bioremediation of polluted soil. Appl Environ Microbiol 64:3368–3375.

Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J (2003) Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 69:220–226.

Tesar M, Reichenauer TG, Sessitsch A (2002) Bacterial rhizosphere communities of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. Soil Biol Biochem 34:1883–1892.

Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting nirs, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. Appl Environ Microbiol 49:401–417.

Torsvik V, Øvereås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr Opin Microbiol 5:240–245.

Von Wintzingerode F, Böcker S, Schlötelburg C, Chiu NH, Storm N, Jurinke C, Cantor CR, Göbel UB, Van den Boom D (2002) Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analysed by mass spectrometry: A tool for rapid bacterial identification. Proc Natl Acad Sci USA 99:7039–7044.

Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Mol Ecol 15:1419–1439.

White DC, Flemming CA, Leung KT, MacNaughton SJ (1998) In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of population remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. J Microbiol Methods 32:93–105.

Widada J, Nojiri H, Kasuga K, Yoshida T, Habe H, Omori T (2002) Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Appl Microbiol Biotechnol 58:202–209.

Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ (1999) Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. Appl Environ Microbiol 65:374–380.

Wikipedia the Free Encyclopedia, November 2005a, http://en. wikipedia. org/ wiki/Polycyclic-aromatic-hydrocarbons.

Wikipedia the Free Encyclopedia, November 2005b, http://en.wikipedia. org/ wiki/Naphthalene.

Wikipedia the Free Encyclopedia, November 2005c, http://en.wikipedia. org/ wiki/Toluene.

Wikipedia the Free Encyclopedia, January 2006a, http://en.wikipedia. org/ wiki/Pollution.

Willison JC (2004) Isolation and characterisation of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. Microbiol Lett 241:143–150.

Wünsche L, Brüggemann L, Babel W (1995) Determination of substrate utilisation patterns of soil microbial communities: an approach to asses population changes after hydrocarbon pollution. Microbiol Ecol 17:295–306.

Yeager CM, Northup DE, Grow CC, Barns SM, Kuske CR (2005) Changes in nitrogen-fixing and ammonia oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. Appl Environ Microbiol 71:2713–2722.

Zehr JP, McReynolds LA (1989) Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium Trichodesmium thiebautii. Appl Environ Microbiol 55:2522–2526.

Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu LY, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. Appl Environ Microbiol 68:326–334.

فصل هفتم

راهبردهای زیست‌پالایی خاک
بر اساس استفاده از آنزیم‌های قارچی

Christian Mougin, Hassan Boukcim, and Claude Jolivalt

۷-۱- مقدمه

آلودگی خاکِ ناشی از فعالیت‌های انسانی توجه زیادی را در مقایسه با فعالیت‌های صنعتی در دو قرن گذشته به خود معطوف داشته است. بر اساس برآوردهای اخیر، در حدود ۲۵۰۰۰۰ منطقه از خاک در کشورهای عضو منطقه اقتصادی اروپا[1] (EEA) دارای آلودگی است که نیاز به پاک‌سازی دارد و انتظار می‌رود که این تعداد نیز افزایش پیدا کند. تعداد مکان‌های نیازمند پالایش تا سال ۲۰۲۵ حدود ۵۰ درصد افزایش خواهد یافت. در فرانسه، حدود ۴۰۰۰ مکان آلوده صنعتی شناسایی شده که بیش از ۷۰ درصد آن‌ها را ته‌نشست‌ها و خاک زیرسطحی و یا منابع آب سطحی آلوده شامل می‌شوند (BASOL ۲۰۰۸). افزون بر این، خاک‌های کشاورزی هم با مواد شیمیایی متعدد ناشی از رسوب اتمسفری (فلزها)، آلودگی مستقیم (مانند استفاده از حشره‌کش‌ها) یا تیمار با بقایای آلی مانند فاضلاب، لجن و دفن کمپوست آلوده شده‌اند. به دلیل پیامدهای آلودگی روی محیط زیست (تنوع اکولوژیک، عملکرد زیست‌بوم) و سلامت انسان (کیفیت هوا و منابع آب)، توسعه فرایندهای بازسازی خاک به یک چالش بزرگ تبدیل شده است.

افزون بر این، پیشرفت اخیر در رابطه با گیاهان زراعی در راستای شیمی سبز، شامل تولید مواد و سوخت‌های زیستی، قابلیت دسترسی جهانی خاک‌ها را برای تغذیه و تولید غذا محدود می‌کند. معمولاً از خاک‌های آلودگی‌زدایی شده برای تولید محصولات کشاورزی استفاده نمی‌شود. زیرا آن‌ها خطر بالایی برای سلامت انسان دارند، اما انتظار می‌رود که خاک‌های مناسبی برای محصولات زراعی صنعتی باشند. در مورد آلودگی پخش شده، روش‌های زیست‌پالایی در محل برای پالایش سطوح بزرگی از خاک‌های آلوده بهتر سازگار شده‌اند. این اراضی پالایش شده با هزینه مقبول اقتصادی برای مصارف کم خطرتر مناسب هستند. توسعه برنامه‌های کشت دوباره در مقیاس وسیع که در آن از قارچ‌های همزیست (قارچ‌های رشته‌ای یا آنزیم‌های برون‌یاخته‌ای) به همراه روش‌های زیست‌پالایی استفاده می‌شود، سهم زیادی در تعیین ارزش خاک‌های آلوده دارد.

از میان فرایندهای موجود که امکان استفاده دوباره از خاک‌های پالایش شده را می‌دهد، زیست‌پالایی در اولویت است. این روش توانایی ریزجانداران را برای تغییر شکل آلاینده‌ها به کار می‌گیرد و در نتیجه راه‌حل‌های دائمی مانند تثبیت کردن یا تجزیه آلاینده‌ها را ارائه می‌دهد. قارچ‌های رشته‌ای و به ویژه سویه‌های تجزیه کننده لیگنین (عامل ایجاد پوسیدگی سفید) به دلیل توانایی قدرتمند آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و برای حداقل دو دهه برای هدف قرار دادن آلاینده‌های ویژه در ضایعات و خاک‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (آیوست ۱۹۸۹، آیتکن ۱۹۹۳، بار و آیوست، ۱۹۹۴).

---

1. European Economic Area

در هرحال، استفاده از ریزجانداران دارای مشکلات زیادی است (ویتلی و لی، ۲۰۰۶). تنها از انباشت آلاینده‌های بسیار سمی در محیط می‌توان بر این واقعیت تاکید داشت که ریزجانداران، به خودی خود، برای حفاظت زیست‌کره از آلودگی‌های ایجاد شده توسط انسان کافی نیستند. از این گذشته، اگرچه ریزجانداران ممکن است دگرگونی آلاینده‌ها را افزایش دهند، که سبب تبدیل آن‌ها به عوامل موثرتری برای تجزیه زیستی می‌شود، اما این کار نیاز به مقدار زیست توده قابل توجهی دارد. روش‌های تحریک زیستی هم توانایی محدودی دارند. چراکه هر باکتری خاص که قادر به پالایش یک آلاینده است ممکن است در حضور دیگر آلاینده‌ها مهار شود. یکی دیگر از عوامل محدود کننده در زیست‌پالایی مکان‌های آلوده سرعت بسیار پایین تجزیه است، که آن‌هم قابلیت اجرایی استفاده از ریزجانداران در این فرایندها را بیشتر محدود می‌کند.

در این‌جا، ما می‌خواهیم نشان دهیم که به نظر آنزیم‌های قارچی ابزار امیدوارکننده‌ای برای پالایش خاک‌های نسبتاً آلوده هستند و فناوری مبتنی بر آنزیم حتی می‌تواند در آلودگی‌های مقیاس بزرگ‌تر نیز استفاده شود. ما در این فصل اصول مهم زیست‌پالایی خاک را شرح داده، اهمیت آنزیم‌های قارچی در زیست‌پالایی خاک را مورد بحث قرار داده و برخی چشم‌اندازها برای پژوهش‌های آینده را به منظور بهبود بهره‌وری از این ابزارها ارائه خواهیم کرد.

۷-۲- اصول زیست‌پالایی خاک

۷-۲-۱- تعاریف

ماهیت و منشاء آلودگی به دلیل فعالیت‌های انسانی (صنعت، کشاورزی، حمل و نقل و غیره)، متغیر هستند. رشد پیوسته‌ی آلاینده‌های آلی و فلزی به دلیل فعالیت‌های انسانی، تولید کشاورزی، عملکرد زیست‌بوم و کیفیت خاک و آب‌های زیرسطحی را به خطر انداخته است. با توجه به وسعت آلودگی‌ها، می‌توانیم بین دو نوع آلودگی تفاوت قائل شویم:

- آلودگی پخش شده که سطح قابل توجهی از خاک را متاثر می‌کند، و منشا آن عمدتاً کاربرد محصولات جامد یا مایع (مانند حشره‌کش‌ها) یا ریزش‌های جوی است.
- آلودگی نقطه‌ای، که سطح محدودی را در برمی‌گیرد و معمولا به صورت تصادفی یا پیوسته رخ می‌دهد و بیشتر ناشی از فعالیت‌های صنعتی است.

آلاینده‌ها می‌توانند ترکیب‌های معدنی یا آلی باشند. فلزهای سنگین و روغن معدنی به عنوان آلاینده‌های اصلی خاک شناسایی شده‌اند و پس از آن‌ها آلاینده‌های آلی شامل هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و ساده قرار دارند.

دو روش کلی برای پالایش خاک توسعه پیدا کرده است: (۱) در محل بدون حفاری و (۲) خارج از محل با حفاری. روش اول برای آلودگی عمقی خاک توسط آلاینده‌هایی که اغلب فرارند مفید

است. از این روش در آلودگی‌های سطح وسیع نیز می‌توان استفاده کرد. فرایندهای خارج از محل با حفاری یا برداشتن خاک آلوده شروع می‌شوند، که می‌توان در ادامه خاک حفاری شده را به یک کارخانه یا تاسیسات پالایشی (پالایش خارج از محل) منتقل کرد یا در همان جا پالایش نمود. تنها در فرایندهای خارج از محل بهینه‌سازی کارآمد پارامترهای انکوباسیون شامل pH، تهویه، هم‌زدن (تکان دادن)، رطوبت و افزودن پذیرنده‌های الکترون مناسب، مواد غذایی، حلال‌ها یا سورفکتنت‌ها امکان‌پذیر است. در فرایندهای خارج از محل سرعت واجذب آلودگی افزایش یافته و فعالیت ریزجانداران بومی را با فراهم نمودن مواد غذایی یا افزودنی‌ها به طور ویژه (تحریک زیستی) افزایش می‌دهند. جداسازی و یا تولید جانداران یا آنزیم‌های تجزیه کننده که به مواد آلوده وارد می‌شوند (تشدید زیستی) هم جزء موارد پالایش در این فرایند هستند.

۷-۲-۲- فنّاوری‌های زیست‌پالایی

فنّاوری‌های زیست‌پالایی شامل مجموعه‌ای از سیستم‌های زیستی است که از ریزجانداران برای پاک‌سازی انواع گوناگون محیط‌های آلوده شامل هوا، آب یا خاک استفاده می‌کنند. هدف زیست‌پالایی کاهش مقادیر آلودگی در خاک با هرگونه فرایند طبیعی است. زیست‌پالایی تسریع شده شامل افزایش سرعت تجزیه زیستی یا دگرگونی زیستی آلاینده‌ها توسط تشدید یا تحریک زیستی است. در تحریک زیستی، ویژگی‌هایی از خاک مانند pH، اقلیم خاک[1] و پتانسیل رداکس (اکسایش-کاهش) را می‌توان با مواد افزودنی تغییر داد. در بیشتر موارد تحریک زیستی و تشدید زیستی همراه با تامین مواد غذایی هستند، تا رشد میکروبی افزایش یابد و تجزیه ضایعات خطرناک زیست محیطی بهبود پیدا کند (ویتلی و لی، ۲۰۰۶).

راکتور زیستی دوغابی، دپو کردن زیستی و زمین‌پالایی روش‌های اصلی هستند که عموما برای زیست‌پالایی خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار می‌گیرند و با کاربرد آنزیم‌های قارچی هم سازگار هستند. در راکتور زیستی دوغابی، آب با خاک آلوده‌ی الک شده مخلوط می‌شود تا دوغاب تولید شود و دوغاب در راکتور زیستی پالایش می‌شود. استفاده از راکتورها سبب تجزیه سریع آلاینده‌ها می‌شود، زیرا سرعت انتقال جرم زیاد می‌شود و تماس آلاینده با ریزجاندار افزایش می‌یابد. این سیستم می‌تواند با افزودن مواد غذایی، پذیرنده‌های الکترون، سورفکتنت‌ها و جانداران تجزیه کننده (بومی یا غیربومی) به آن تکمیل شود. واحدهای پالایشی ساکن یا مخلوط، پالایش غلظت زیاد آلاینده‌ها در لجن را امکان‌پذیر می‌سازد. خاک‌هایی که رس زیادی دارند به آسانی توسط دوغاب

1. Pedoclimate

زیستی پالایش می‌شوند. دیگر روش‌ها شامل ترکیب فرایندهای اکسایش پیشرفته (استفاده به صورت متوالی یا هم‌زمان) با دگرگونی زیستی (مانند افزودن عامل فنتون) (موگین ۲۰۰۲) است.

دپو کردن زیستی شامل حفاری و استخراج خاک، غربال کردن و جمع کردن آن به شکل یک توده است. خاک روی یک لایه محافظ زیرین دپو می‌شود. لوله‌های سوراخ‌دار در سراسر پایل (خاک دپو شده) قرار داده می‌شوندکه زه‌آب خروجی از خاک را جمع می‌کنند و هوا از طریق آن‌ها به روش تزریق یا مکش به درون پایل وارد می‌شود (دپو کردن زیستی ثابت). در دپو کردن زیستی پویا (متحرک) به منظور اطمینان از تهویه، خاک به صورت دوره‌ای زیر و رو شده و شخم می‌خورد. با این وجود، در هر دو روش نیاز است که خاک در زمان‌های ویژه شخم زده شود و یا زیر و رو شود تا شرایط تجزیه زیستی به طور پیوسته بهبود یابد. افزون بر این، سیستم آب‌رسانی در بالای پایل، آب، سورفکتنت‌ها و مواد غذایی را در تمام خاک پخش می‌کند. تمامی مواد را می‌توان با یک پوشش گورتکس[1] یا گلخانه‌ای پوشش داد تا دمای تنظیم شده و تبخیر آب کم شود. در طول پالایش، ترکیب‌های فرار به جای تجزیه زیستی تمایل به تبخیر شدن دارند. تولید بخار در طول هوادهی می‌تواند کنترل و پالایش شود. یک روش مرتبط کمپوست کردن با افزودن کودهایی مانند کود حیوانی است (EPA ۲۰۰۸).

زمین‌پالایی همانند دپوکردن زیستی است با این تفاوت که سیستم در سطح زمین مستقر می‌شود و از اکسیژن هوا برای تجزیه آلاینده‌ها استفاده می‌کند. بر خلاف دپوکردن زیستی، در زمین‌پالایی خاک حفاری شده روی سطح زمین پخش می‌شود و به صورت دوره‌ای با شخم زدن یا زیرو رو کردن هوادهی انجام می‌شود تا رشد ریزجانداران تقویت شود. در برخی موارد، خاک آلوده با لایه رویینِ یک خاک کشاورزی مخلوط می‌شود. ممکن است مواد غذایی و رطوبت هم به سیستم اضافه شود و به جمع‌آوری شیرابه هم نیاز باشد. همه نوع خاک آلوده با آلاینده‌های آلی و فلزهای سنگین را می‌توان زمین‌پالایی کرد (موگین، ۲۰۰۲).

۷-۲-۳- مزیت‌های زیست‌پالایی در مقابل فرایندهای فیزیکو- شیمیایی

در مقایسه با روش‌های پالایش فیزیکی یا شیمیایی، زیست‌پالایی اهمیت بالایی در بازسازی (نوسازی- پالایش) پایدارِ جایگاه‌های آلوده، بدون ایجاد تغییرات شدید در ویژگی‌های خاک را دارد. روش‌های زیست‌پالایی برای مکان‌هایی در الویت هستند که در آن‌ها ضرورت فوری برای بازسازی وجود ندارد و یا مکان‌هایی که با روش‌های سنتی آلودگی‌زدایی سازگار نبوده و این روش‌ها در آن‌جا اثربخش نیستند. این روش‌ها همچنین می‌توانند با روش کاهش طبیعی غلظت آلاینده تقویت شده[2]

1. Gore-tex
2. Enhanced natural attenuation

همراه شـوند، که شـامل تحریک توانایی‌های زیست‌بوم برای توسعه یا بازسازی خود است. در بیشتر موارد، خاک پالایش شده با این روش‌ها را می‌توان دوباره استفاده کرد.

چندین عامل حاکی از آن اسـت که در میان روش‌های پالایشی، زیست‌پالایی یک روش مناسب نسـبت به پالایش‌های فیزیکی - شیمیایی است. اولین عامل در ارتباط با آلاینده است. به طور کلی، ترکیب‌های شـیمیایی معمول اگر زیست فراهم باشند، به خوبی توسط ریزجانداران تجزیه می‌شوند. در سـوی دیگر، به نظر می‌رسـد که افزایش سـن آلاینده تجزیه زیسـتی آن را محدود می‌کند، به طوری‌که فراهمی آلاینده برای آنزیم‌های تجزیه کننده کمتر می‌شـود. فن‌آوری‌های زیسـت‌پالایی را می‌توان برای همه انواع خاک‌ها با هر بافت یا نفوذپذیری به کار برد. این روش‌ها تا حدودی توسـط محدودیت‌های مکانی، مانند فضـا، سـر و صـدا، بو و گرد و غبار کنترل می‌شـوند. به دیگر سخن، در مناطق شـهری روش‌های خارج از محل مفید هسـتند. مزایای فرایندهای زیست‌پالایی این است که آن‌ها از نظر اقتصـادی و زیسـت‌محیطی راه حل‌های قابل قبولی هسـتند. این روش‌ها هزینه‌های پایینی دارند و اگر آلاینده هدف به سـطوح قابل قبول در خاک پالایش شـده برسد می‌توان خاک را دوباره اسـتفاده کرد. عیب این روش‌ها این اسـت که رسـیدن آلاینده به غلظت آسـتانه مورد نظر نیازمند زمان طولانی است.

۷-۲-۴- مسیرهای دگرگونی زیستی آلاینده‌های آلی

دگرگونی زیسـتی آلاینده‌های آلی می‌تواند به سـبب متابولیسم مستقیم یا اثر غیرمستقیم جانداران بر روی محیط باشـد (مولر و همکاران، ۱۹۹۶). سـه فرایندِ تجزیه زیسـتی، کومتابولیسـم و سـنتز (ساخت) در متابولیسم مستقیم درگیر هستند.

در تجزیه زیستی، یک یا چند جاندار ترکیب زیست‌بیگانه موردنظر را به دی‌اکسید کربن و دیگر اجزای معدنی متابولیزه می‌کنند. در این روش، جانداران نیازهای رشـدی و انرژی خودشـان را از مولکول (آلی) به دست می‌آورند. از دیدگاه زیست محیطی، تجزیه زیستی با ارزش‌ترین و جالب‌ترین فرایند است، زیرا سبب شکستن کامل یک مولکول بدون تولید واسطه‌های تجمع کننده می‌شود.

شـکل متداول متابولیسـم ترکیب زیست‌بیگانه در محیط کومتابولیسم است، که در آن جانداران با مصـرف یک سـوبسـترای مشترک رشد می‌کنند تا ترکیب زیست‌بیگانه را دگرگون کنند و در این فرآیند، هیچ ماده غذایی یا انرژی به دسـت نمی‌آورند. کومتابولیسـم یک متابولیسـم نسبی و اتفاقی اسـت و آنزیم‌های درگیر شـده در واکنش اولیه ویژگی اختصـاصـی بودن برای سـوبسـترا را ندارند. معمولاً کومتابولیسـم تنها سبب تغییرات اندک در ساختار ترکیب زیست‌بیگانه می‌شود. اما جانداران متفـاوت می‌تواننـد یـک مولکول را بـا حملـه‌هـای کومتـابولیـک پی در پی دگرگون کنند، یا دیگر جانداران می‌توانند از فرآورده‌ی کومتابولیک یک جاندار به عنوان سـوبسـترای رشـد اسـتفاده کنند.

فرآورده‌های حد واسط با ویژگی‌های زیستی و فیزیکی- شیمیایی خاص خود هم می‌توانند تجمع یابند که سبب پیامدهای نامناسب بر محیط زیست می‌شوند.

سنتز (ساخت) شامل پیوند مولکول‌ها با هم و اولیگومر شدن[1] است. ترکیب‌های زیست‌بیگانه به ترکیب‌هایی با ساختارهای شیمیایی پیچیده‌تر از ماده اولیه دگرگون می‌شوند. در فرایند پیوستن مولکول‌ها، یک ترکیب زیست‌بیگانه (یا یکی از فرآورده‌های فرعی دگرگون شده‌ی آن) به سوبستراهای بومی آب‌دوست متصل شده و ترکیب‌های متیله، استیله یا آلکیله شده، گلیکوزیدها یا ترکیب‌های مزدوج آمینو اسیدی را تشکیل می‌دهد. این ترکیب‌ها می‌توانند از یاخته‌های زنده دفع شده یا در آن‌ها ذخیره شوند. در طول اولیگومر شدن (یا پیوند اکسیداتیو)، یک ترکیب زیست‌بیگانه با خودش، یا با بقایای یک ترکیب زیست‌بیگانه دیگر (پروتئین‌ها، بقایای آلی خاک) ترکیب می‌شود. در نتیجه، ترکیب‌های با وزن مولکولی بالا تولید می‌شود، که پایدار بوده و اغلب جزئی از اجزای یاخته (دیواره یاخته) یا ترکیب‌های خاک (مواد آلی خاک) می‌شود. این فرایند نه تنها با محدود کردن فراهمی زیستی، فعالیت و تجزیه‌پذیری یک ترکیب را تحت تاثیر قرار می‌دهد، بلکه نگرانی در رابطه با پیامد زیست محیطی این بقایای به هم متصل شده را نیز افزایش می‌دهد.

۷-۲-۵- زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به فلز

در حال حاضر، فناوری‌هایی که بیشتر برای تثبیت خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل مهار کردن و تثبیت/ پایداری، یا ته‌نشینی و تخلیه هستند. برخی از گونه‌های گیاهی گنجایش طبیعی برای تثبیت، تجزیه یا حذف ترکیب‌های شیمیایی سمی و آلاینده‌ها از خاک‌ها را دارند. استقرار پوشش گیاهی در یک خاک آلوده یک راه حل زیست‌پالایی مقرون به صرفه بوده و مکمل روش‌های موجود آلودگی‌زدایی است. بیش از ۹۰ درصد از گونه‌های گیاهی همزیستی مایکوریزایی تشکیل می‌دهند که بین ریشه‌های گیاهان فتوسنتزکننده و میسیلیوم قارچ‌های عالی برقرار می‌شود. این مشارکت همزیستی نقشی بدیهی در کاهش تحرک و سمیت فلز بازی می‌کند (اسمیت و رد، ۱۹۹۷).

بیشتر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که قارچ‌های مایکوریزای بیرونی سازوکارهای درون یاخته‌ای و برون یاخته‌ای دارند که به آن‌ها امکان مقاومت بیشتر در برابر آلاینده‌های فلزی در مقایسه با گیاه میزبان غیرمایکوریزایی می‌دهد. سازوکارهای شناسایی شده ترکیبی از کاهش جذب فلزها در سیتوپلاسم و ناپویا کردن آلاینده‌های فلزی در بیرون یاخته با ترشح لیگاندها به محیط، یا نگه‌داری آن‌ها روی دیواره یاخته قارچ را شامل می‌شود (بلیون و همکاران، ۲۰۰۶). برخی از گونه‌های قارچی

1. Oligomerization

از شـاخه بازیدیومایکوتا[1] توانایی تولید مقادیر زیادی متالوتیونین را دارند که سیتوپلاسم آن‌ها را در برابر تنش فلزی سمیت‌زدایی می‌کند (کُربوت و همکاران، ۲۰۰۴).

تفـاوت‌های عمده‌ای میان گونه‌های قارچی و ایزوله‌ها از نظر گنجایش تثبیت آلاینده‌ها و اعطای توان بردباری به گیاه میزبان در برابر سـمیت دیده شده است. قارچ‌های جداسازی شده از مکان‌های آلوده‌ی صنعتی در مقایسه با جدایه‌های قارچ به دست آمده از مکان‌های غیرآلوده، مقاومت بیشتری در برابر سـطوح بالای فلز سـنگین نشـان می‌دهند. آن‌ها همچنین قادر به انتقال مقاومتشـان به گیاهان میزبانی هسـتند که با آن‌ها ارتباط دارند (آدریاسـون و همکاران، ۲۰۰۴، ۲۰۰۵؛ کُلپائرت و وَن‌آسک، ۱۹۸۷، ۱۹۹۲).

آگاهی از ساز و کارهای درگیر در مقاومت برخی از قارچ‌های همزیست به آلاینده‌های فلزی این امکان را فراهم می‌آورد که با توجه به انباشت و ناپویا کردن آلاینده‌ها در ریشه‌ی گیاهان و قارچ‌های همزیسـت مرتبط، آن‌ها نیز در پالایش خاک‌ها مشـارکت داده شـوند. این هدف نیازمند انتخاب گونه‌های قارچی موثر و سازگار شده و بهینه‌سازی کاربرد آن‌ها در شرایط مکانی است.

۷-۳- رابطه آنزیم‌های قارچی در زیست‌پالایی خاک

۷-۳-۱- قارچ‌های رشته‌ای

تجزیه ترکیب‌های آلی (طبیعی یا زیسـت‌بیگانه) از طریق فرایندهای متابولیکی زیسـتی به عنوان اولین سـاز و کار دگرگونی زیسـتی مورد توجه قرار گرفته اسـت. گروه‌های مختلفی از ریزجانداران می‌توانند در بیشـترِ دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی نقش (واسطه) داشته باشند. فراوان‌ترین جانداران خاک باکتری‌ها هسـتند، در حالی‌که قارچ‌ها بزرگ‌ترین زیسـت توده را تشـکیل می‌دهند. آن‌ها در کارهای زیادی مانند معدنی شدن و هوموسی شدن مواد آلی خاک، چرخه‌های زیست‌زمین‌شیمیایی، تولید سـموم و ترکیب‌های صـنعتی (آنتی‌بیوتیک)، و تجزیه آلاینده‌ها درگیر هسـتند. قارچ‌های یوکاریوتی شـامل قارچ‌های رشـته‌ای[2] (کپک‌ها)، سـفیدک‌های پودری (حقیقی)[3]، قارچ‌های زنگی و چتری[4] (همگی هوازی هستند)، و همچنین مخمرها (جانداران تخمیری) هستند. قارچ‌های رشته‌ای با انشـعاب گسـترده و رشـد میسـیلیومی و همچنین تولید اسـپورهای جنسـی (در آسـک و بازیدیومایسـت‌ها) و غیرجنسـی مشخص می‌شوند. دئوترومایست‌ها[5] (قارچ‌های ناقص) توانایی تولید مثل جنسـی ندارند، اما در برخی از آن‌ها یک مرحله تولید مثل جنسی شناسایی شده است، که در

1. Basidiomycota
2. Molds
3. Mildews
4. Rusts and mushrooms
5. Deuteromycetes

این صـــورت این قارچ در گروه‌های دیگر طبقه‌بندی می‌شـــود. قارچ‌ها در مقایســـه با باکتری‌ها به خاک‌های اسـیدی و رطوبت کم مقاوم‌ترند. آن‌ها می‌توانند برای گیاهان و حیوانات بیماری‌زا باشند، یا با گیاهان در تشکیل مایکوریزا همراه شوند.

۷-۳-۲- اکسیدازهای قارچی

قارچ‌های رشته‌ای مانند بازیدیومیست‌های پوسیدگی سفید[1]، که از تجزیه کنندگان اصلی پلی‌مرهای زیسـتی هستند، ساز و کارهای تجزیه غیراختصاصی و کامل را در محیط برون یاخته‌ای خود توسعه داده‌انـد. در پژوهش‌هـای زیـادی بـه نقش تجهیزات آنزیمی (مـانـنـد لاکـاز، لیگنین پراکســـیداز و پراکسیداز وابسته به منگنز) قارچ‌های تجزیه کننده لیگنین در توانایی این قارچ‌ها به دگرگونی طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی در خاک‌های آلوده اشاره شده است (پوینتینگ، ۲۰۰۱؛ ریواف ۲۰۰۶؛ آنکهف ۲۰۰۶؛ گیان‌فردا و رائو، ۲۰۰۴؛ بالدریان، ۲۰۰۶).

۷-۳-۲-۱- پراکسیدازها

لیگنین پراکســـیـداز (LiP) و منگنز پراکســـیـداز (MnP) در اواســـط دهه ۱۹۸۰ و در قارچ *پی. کرایزوســپوریوم*[2] کشـف شـدند و به دلیل پتانسیل رداکس بالای آن‌ها به عنوان لیگنینازهای واقعی توصـیف شـدند (مارتینز، ۲۰۰۲). LiP و MnP اکسـیداسیون واحدهای لیگنین را به وسیله H_2O_2 تسـریع می‌کنند. LiP واحدهای غیرفنولی لیگنین را تجزیه می‌کند (تا ۹۰ درصد پلی‌مر)، و MnP، یون Mn^{3+} تولید می‌کند، که به عنوان یک اکسید کننده قابل نفوذ روی واحدهای فنولی وغیرفنولی لیگنین، از طریق واکنش‌های پراکســیداســیون لیپیدی عمل می‌کند (جنســن و همکاران، ۱۹۹۶). اخیراً، پراکسیداز چندکاره[3] (VP) در *پلیوروتوس*[4] (کامارِرُ و همکاران، ۱۹۹۹) و دیگر قارچ‌ها (پُگنی و همکاران، ۲۰۰۵) شـناسـایی شـده که نوع سـوم پراکسـیداز تجزیه کننده لیگنین اسـت. این نوع پراکسیداز ویژگی‌های کاتالیتیک LiP و MnP را ترکیب می‌کند (حین‌فلینگ و همکاران، ۱۹۹۸) و می‌تواند سوبستراهای ویژه LiP و MnP را اکسید کند.

پراکســیدازها ویژگی‌های سـاختاری و متابولیکی مشـترکی دارند: آن‌ها پروتئین‌های گلیکوزیله شـده با یک گروه پروسـتتیک پروتوپورفیرین آهن[5] IX (هِم) در جایگاه فعال هسـتند. سـاز و کار متابولیکی آن‌ها شـامل اکسـایش دو الکترونی از بخش هِم به یک اُکسـو- فریل واسـطه با پتانسـیل

1. White-rot
2. *Phanaerochaete chrysosporium*
3. Versatile peroxidase
4. *Pleurotus*
5. Iron protoporphyrin

رداکس بالا است که به آن ترکیب I گفته می‌شود. این واکنش دو الکترونی به آنزیم فعال شده اجازه می‌دهد که دو واحد سوبسترا را اکسید کند. دو واکنش تک الکترونی متوالی آنزیم را با استفاده از یک واسطه ثانویه به نام ترکیب II (شکل اکسید شده تک الکترونی) به حالت اولیه (غیرفعال) برمی‌گرداند (ویچ، ۲۰۰۴). سوبسترای کاهنده اولیه در چرخه متابولیکی MnP، یون Mn^{2+} است که به طور کارآمدی ترکیب I و II را کاهش می‌دهد، Mn^{3+} تولید می‌کند، که توسط کلات کننده‌هایی مانند اسید اگزالیک پایدار می‌شوند، که آن‌هم توسط خود قارچ ترشح می‌شود. Mn^{3+} کلات شده به عنوان یک واسطه رداکس با قابلیت پخشیدگی بالا، وزن مولکولی پایین و بسیار واکنش‌پذیر عمل می‌کند. پتانسیل رداکس آن، تا ۱/۵ ولت بالا می‌رود که به نوبه خود می‌تواند سوبسترای آلی را اکسید کند. بنابراین، آنزیم‌های MnP قادر به اکسید کردن و دپلیمره کردن سوبسترای طبیعی یعنی لیگنین و همچنین ترکیب‌های زیست‌بیگانه مقاوم مانند نیتروآمینوتولوئن‌ها و رنگ‌های نساجی هستند (ناتسون و همکاران، ۲۰۰۵؛ وِسن‌برگ و همکاران، ۲۰۰۳)..

پاک‌سازی فنول به وسیله پراکسیداز صنعتی ترب کوهی[1] (وانگر و نیسل، ۲۰۰۲) یا پراکسیداز سویا (ریان و همکاران، ۲۰۰۶) گزارش شده است، اما مشکلات زیادی از جمله عدم تحمل غلظت‌های زیاد سوبسترای اولیه H_2O_2، قابلیت کم استفاده دوباره از آنزیم و هزینه‌های مالی، کاربرد گسترده آن را محدود می‌کند (نیسل و رایت، ۱۹۹۷). بُدالو و همکاران (۲۰۰۵) اشاره کردند که انتخاب پراکسیداز برای پالایش پساب همچنین به ویژگی‌های آن، نیازهای عملیاتی و هزینه‌ها وابسته است. استفاده از پراکسیدازها در پاک‌سازی خاک، به ویژه برای خاک‌هایی که سابقه آلودگی با هیدروکربن‌های آروماتیک داشته و به وسیله قارچ‌های بومی تولید کننده پراکسیدازها سمیت‌زدایی شده‌اند، مورد مطالعه قرار گرفته است (دِآنیبال و همکاران، ۲۰۰۶).

۷-۳-۲-۲- لاکازها

لاکازها متعلق به گروه بزرگی از آنزیم‌ها به نام اکسیدازهای چند مسی هستند. آسکوربات اکسیدازها و سرولوپلاسمین[2] هم از جمله دیگر آنزیم‌های این گروه هستند. نام آن‌ها از لاک (یا جلای) گیاهی گرفته شده است که برای اولین بار به وسیله یوشیدا[3] در سال ۱۸۸۳ در *روس ورنیسیفرا*[4] توصیف شدند و از قدیمی‌ترین آنزیم‌هایی هستند که تا به حال شناسایی شده‌اند. آن‌ها به وسیله گیاهان،

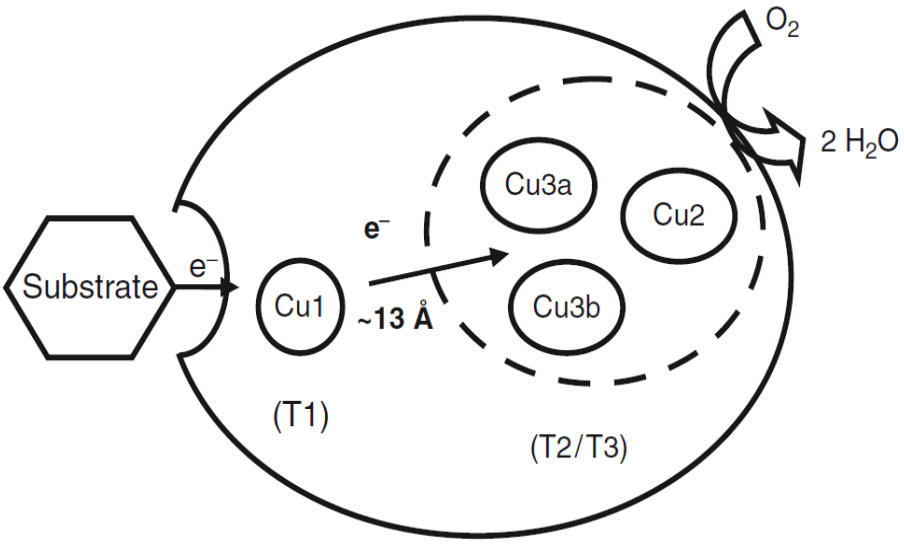
1. Commercial horse radish peroxidase
2. Ceruloplasmin
3. Yoshida
4. *Rhus vernicifera*

حشـرات[1] (*بامبیکس*)، باکتری‌ها (*آ. لیپوفروم*[2]) تولید می‌شـوند و همچنین به طور گسـترده‌ای در قارچ‌های رشـته‌ای تجزیه کننده لیگنین حضـور دارند، که شـامل بازیدیومیسـت پوسـیدگی سـفید *ترامتس ورسـیکالر*[3] اسـت. آن‌ها می‌توانند دو اتم اکسیژن را به آب کاهش دهند و سوبستراهای آلی را به وسـیله یک فرایند رداکس تک الکترونی اکسـید کنند. لاکازها می‌توانند دامنه گسـترده‌ای از سـوبسـتراهای آروماتیک، به طور عمده فنولی و آنیلین‌ها، را اکسـید کنند. لاکازها چهار یون مس دارند که در سـه جایگاه توزیع شـده‌اند. این جایگاه‌ها بر اسـاس ویژگی‌های طیف‌سـنجی شـناسایی می‌شـوند. جایگاه T1 مس با داشـتن جذب قوی در حدود ۶۰۰nm مشـخص می‌شود و جایگاه T2 مس تنها جذبی ضـعیف را در ناحیه مرئی دارد. جایگاه T2 دارای رزونانس پارامغناطیس الکترون[4] (EPR) فعال است، در حالی‌که دو یون مس جایگاه T3 با توجه به جفت‌شدگی آنتی‌فرومغناطیسی[5] توسـط یک لیگاند اتصـال دهنده، EPR غیرفعال هستند (مِزراسمیت، ۱۹۹۷). سوبستراها به وسیله مس در جایگاه T1 اکسـید می‌شـوند و الکترون‌های استخراج شده، احتمالاً از طریق جزء تری‌پپتید His-Cys-His که به شـدت حفاظت شده است، به جایگاه T2/T3 که کاهش اکسیژن مولکولی به آب رخ می‌دهـد، منتقـل می‌شـوند (شـکل ۷-۱). با وجود مقدار قابل توجهی از اطلاعات موجود درباره‌ی لاکازها و همچنین دیگر اکسـیدازهای مس آبی رنگ مرتبط، جزئیات فرایند کاهش دو اتم اکسیژن در این آنزیم‌ها به طور کامل شناخته شده نیست (گاراواگلیا و همکاران، ۲۰۰۴).

اخیراً نشـان داده شـده که قارچ‌های پوسیدگی سفید که روی سوبستراهای دارای لیگنین جامد طبیعی کشت می‌شوند شکل دیگری از لاکازها را تولید می‌کنند، که فاقد مس T1 است و لاکازهای زرد نـامیـده می‌شـونـد. زیرا این آنزیم‌هـا جذب نور مشـخص در ۶۰۰ nm را نشـان نمی‌دهند (لئون‌تیوسـکی و همکاران، ۱۹۹۷). یکی از ویژگی‌های جالب در مورد این آنزیم‌ها این اسـت که به نظر می‌رسـد آن‌ها فعالیت نسـبتاً بالایی در تجزیه برخی از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای نشان می‌دهند (پُزدنیاکووا و همکاران، ۲۰۰۴).

---

1. *Bombyx* sp.
2. *lipoferum*
3. *Trametes versicolor*
4. Electron paramagnetic resonance
5. Antiferromagnetic



شکل ۷-۱ اصول واکنش اکسایش- کاهش (احیاء) تسریع شده توسط لاکازها

تا کنون، بیش از ۱۰۰ لاکاز از محیط کشت‌های قارچی خالص‌سازی شده و ویژگی‌های بیوشیمیایی و متابولیکی آن‌ها شناسایی شده است (زو و همکاران، ۱۹۹۶). حضور این آنزیم‌ها، ویژگی‌ها، عملکردها و کاربردهای آن‌ها در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (مایر و استاپلز، ۲۰۰۲؛ موگین و همکاران، ۲۰۰۳؛ بالدریان، ۲۰۰۶؛ ریوا، ۲۰۰۶). کارکردهای زیستی لاکازها تنوع آن‌ها را بازتاب داده و به روشنی به ریزجانداران تولید کننده وابسته است. آن‌ها در بسیاری از فرایندهای داخل بدن مانند تغییر رنگ[1]، ساخت زیستی دیواره یاخته‌ی گیاه (که از طریق پلیمریزاسیون اکسیداتیو مونولیگنول‌های ماتریکس دیواره یاخته‌ای حاصل می‌شود)، بیماری‌زایی گیاهی[2] یا سفت و تیره شدن پوست حشرات[3] نقش دارند. لاکازهای قارچی در فرایند لیگنین‌زدایی از چوب درگیر هستند اما نقشی را نیز در مورفوژنز قارچی[4] بازی می‌کنند، و می‌توانند بیماری‌زایی قارچی را تحت تاثیر قرار دهند.

1. Pigmentation
2. Phytopathogenesis
3. Insect sclerotisation
4. Fungal morphogenesis

در کنار اکسایش ترکیب‌های آروماتیک مختلف، لاکازها به عنوان کاتالیست‌های زیستی، پتانسیل خوبی در صنعت دارند و در اصلاح الیاف چوبی در صنعت خمیر کاغذ (lignozym®-process، کال و ماک، ۱۹۹۷)، یا شیمی آلی سبز و پالایش آب/ خاک، به منظور حمایت محیط زیست از خسارت ناشی از پساب‌های شهری یا صنعتی کارآمد هستند (ژو، ۱۹۹۹؛ تورس و همکاران، ۲۰۰۳؛ وسن‌برگ و همکاران، ۲۰۰۳؛ دوبروکا و همکاران، ۲۰۰۵). از نظر تجاری، لاکازها برای سفید کردن پارچه‌ها (Denilite® from Novozyme) یا به عنوان حس‌گر زیستی برای تشخیص بین کدئین و مرفین مورد استفاده قرار می‌گیرند.

یک نکته اساسی برای توضیح پژوهش و فعالیت زیاد در سال‌های اخیر این است که لاکازها ویژگی‌های جالب توجهی را نشان می‌دهند: افزون بر ویژگی غیراختصاصی بودن (که اجازه می‌دهد طیف وسیعی از سوبستراها را دگرگون کنند) و تنوع گسترده آن‌ها، بیشتر لاکازهای قارچی بسیار پایدار هستند، به ویژه در مقادیر pH نزدیک خنثی، جایگاه اکسایش سوبسترای آلی آن‌ها پتانسیل رداکس بالا دارد (در حدود ۰/۷۸ ولت نسبت به الکترود نرمال هیدروژن (NHE))، و در نهایت آن‌ها اکسیژن دو اتمی (O_2) که یک ترکیب فراوان و بی‌ضرر است، را به عنوان یک سوبسترای همراه و به جای پراکسیدِ اکسیژن که توسط سایر اکسیدازها (مانند پراکسیدازها) به کار برده می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌دهند.

بنابراین لاکازها در دگرگونی طیف گسترده‌ای از ترکیب‌های فنلی که شامل سوبستراهای طبیعی مانند لیگنین و سوبستراهای هیومیکی هستند درگیر هستند. آن‌ها همچنین می‌توانند ترکیب‌های زیست‌بیگانه را مانند تری‌کلروفنل‌ها، حشره‌کش‌ها، ترکیب‌های آروماتیک پلی‌نیترات (راموز و همکاران، ۲۰۰۵)، رنگ‌های آزو و PAH ها، که از مهم‌ترین آلاینده‌های خاک هستند و تجزیه آن‌ها از اهمیت زیادی در محیط زیست برخوردار است را دگرگون کنند. توانایی استفاده از آنزیم‌های اکسیداتیو قارچ‌های پوسیدگی سفید برای سمیت‌زدایی این آلاینده‌های آلی به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است (تورس و همکاران، ۲۰۰۳؛ پوینتینگ، ۲۰۰۱؛ جیان‌فِردا و همکاران، ۲۰۰۴؛ موگین و همکاران، ۲۰۰۳؛ کوتو و هررا، ۲۰۰۶).

۷-۳-۳- مواردی از دگرگونی زیستی ترکیب زیست‌بیگانه به واسطه آنزیم‌های قارچی

در این‌جا می‌خواهیم روی سه خانواده از این ترکیب‌ها یعنی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH ها)، ترکیب‌های نیتروآروماتیک و مواد شیمیایی استروژنی فنولی، به دلیل اهمیت حال و آینده آن‌ها در آلودگی خاک تمرکز کنیم.

۷-۳-۳-۱- هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH)

ترکیب‌های PAH آلاینده‌های آلی مقاومی هستند که در محیط‌های خاکی و آبی (سامانتا و همکاران، ۲۰۰۲) به عنوان آلاینده‌های پخش شده (جانسون و کارلسون، ۲۰۰۷) توزیع گسترده دارند. منشاء این آلاینده‌ها احتراق سوخت موتورها یا گاز (دود) کارخانه‌های قدیمی (به عنوان آلاینده‌های موضعی) است. آن‌ها از دو یا چند حلقه بنزن جوش خورده به هم تشکیل شده‌اند و به عنوان (آلاینده‌های) بسیار سمی (با توجه به توانایی جهش‌زایی و سرطان‌زایی، شانزده PAH به عنوان آلاینده‌های دارای ارجحیت توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (موگین، ۲۰۰۲) طبقه‌بندی شده‌اند) شناخته می‌شوند. زیست‌پالایی میکروبی PAH ها از نوامبر ۲۰۰۲، یعنی زمانی‌که از زیست‌پالایی برای حذف آلودگی ناشی از نشت نفت از کشتی پرستیژ[1] در ساحل شمالی اسپانیا استفاده شد، رایج شده است (آلکادِ و همکاران، ۲۰۰۶). ریزجانداران زیادی، شامل باکتری‌ها، مخمرها یا قارچ‌ها شناسایی شده‌اند که می‌توانند PAH ها را تجزیه کنند (موگین، ۲۰۰۲؛ آیتکن و لانگ، ۲۰۰۴). باکتری‌ها این برتری را دارند که می‌توانند از PAH ها به عنوان تنها منبع کربن استفاده کنند اما بر خلاف قارچ‌های خاک نمی‌توانند آن‌ها را به طور کامل معدنی کنند. به منظور ترکیب مزیت‌های هر دو نوع از ریزجانداران، استفاده از ترکیب آن‌ها یک روش امیدوار کننده به نظر می‌رسد (کانِت و همکاران، ۲۰۰۱؛ جانسون و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش شده است که قارچ‌های پوسیدگی سفید در تجزیه PAH موثرند (آناستازیا و همکاران، ۲۰۰۸؛ مولیا و همکاران، ۲۰۰۵؛ کوهن و همکاران، ۲۰۰۲) و در پژوهش‌های زیادی به نقش لاکازها در تجزیه آن‌ها اشاره شده است. جوهانس و همکاران در ۱۹۹۶ گزارش کردند که لاکاز به دست آمده از *ترامتس ورسیکالر* در حدود ۳۵ درصد از آسنافتیلن[2] را در محلول و پس از ۷۲ ساعت اکسید می‌کند. پس از این پژوهش که در این زمینه پیش‌رو بود، نتایج زیادی منتشر شده است که برخی از آن‌ها متناقض هم بوده است. با توجه به پژوهش کولینز و همکاران (۱۹۹۶) و اخیراً هان و همکاران (۲۰۰۴)، لاکاز *ترامتس ورسیکالر* با وجود توان یونیزاسیون بالا، فنانترن را اکسید نمی‌کند، در حالی‌که پیکارد و همکاران (۱۹۹۹) و وو و همکاران (۲۰۰۸) به نتیجه متناقضی رسیدند. به طور کلی گزارش شده است که دگرگونی PAH در حضور واسطه‌هایی مانند ترکیب‌های شیمیایی به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. این واسطه‌ها سوبسترا را برای لاکازها کاهش می‌دهند و سوبسترا در ادامه به وسیله آنزیم به رادیکال‌ها دگرگون می‌شود. در ادامه خود این رادیکال‌ها PAH را اکسید می‌کنند: ۸۰ درصد اکسایش به این روش برای آنتراسن (موگین و همکاران، ۲۰۰۲)، فنانترن (هان و همکاران، ۲۰۰۴) یا بنزو(a) پایرن (موگین، ۲۰۰۲) گزارش شده است. دیده شده است که برخی ترکیب‌های طبیعی

---

1. Prestige
2. Acenaphtylene

مانند تیروزین یا سیستئین می‌توانند به عنوان واسطه‌های بالقوه در این واکنش‌ها باشند (جانسون و مَج‌کیچیک، ۲۰۰۰).

دیده شده است که شماری از ریزجانداران تولید کننده لاکازها، از جمله *پی. اُستراتوس*[1] (بُگان و همکاران، ۱۹۹۹) و *ترامتس ورسیکالر* (راما و همکاران، ۲۰۰۱) PAH را به طور کارآمدی در خاک‌ها دگرگون کردند. هم‌بستگی مثبتی بین تجزیه PAH و فعالیت آنزیمی تجزیه کنندگی لیگنین دیده شده است (نووتنی و همکاران، ۱۹۹۹). به هر حال به نظر می‌رسد که مایه‌زنی قارچ‌های تجزیه کننده PAH برای زیست‌پالایی در شرایط مزرعه با توجه به موارد زیر که فعالیت لاکاز را محدود می‌کنند، دشوار باشد. این موارد شامل شرایط رشدی دور از حالت بهینه، سمیت بالای PAH و احتمال برهم‌کنش بین ریزجانداران است (کانت و همکاران، ۲۰۰۱). پژوهش اخیر توسط وو و همکاران (۲۰۰۸) که درباره‌ی کاربرد مستقیم لاکازهای آزاد در خاک‌های آلوده به PAH بود، نتایج بسیار امیدبخشی را گزارش کرد. به طوری که مخلوطی از پانزده PAH به طور چشم‌گیری تجزیه شدند، آنتراسن و بنزو(a) پایرن هم به ترتیب تا ۸ درصد و ۶۰ درصد دگرگونی داشتند.

۷-۳-۳-۲- ترکیب‌های نیترو- آروماتیک

ترکیب‌های نیترو- آروماتیک در اثر سوختن ناقص سوخت فسیلی یا واکنش‌های نیتراسیون تولید می‌شوند و به عنوان واسطه‌های شیمیایی برای ساخت مواد منفجره (۴،۲، ۶-تری نیتروتولوئن- TNT)، آفت‌کش‌ها (پاراتیون)، رنگ‌ها یا داروها به کار می‌روند. تولید سالانه آن‌ها ۱۰۰ میلیون تن برآورد می‌شود (یه و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین بخش گسترده‌ای از خاک و آب زیرزمینی به شدت به این ترکیب‌های زیست‌بیگانه آلوده می‌شوند. نیتروآروماتیک‌ها به راحتی توسط سیستم‌های نیتروریداکتاز غیراختصاصی پستانداران کاهش می‌یابند (نیشینو و همکاران، ۲۰۰۲). اگرچه، این تبدیل آنزیمی گروه‌های نیترو منجر به مشتقات سرطان‌زای واکنش‌پذیر مانند نیتروز[2] و گروه‌های آمینو هیدروکسیل می‌شود. بنابراین نیترو- آروماتیک‌ها در حال حاضر به عنوان (آلاینده‌های) سخت شناخته شده‌اند و رتبه سوم خطر را دریافت کرده‌اند، که نشان دهنده بدترین سطح خطر و یا سمیت است (ساکس و لوئیس، ۱۹۹۹). در طول چند دهه گذشته، پژوهش‌های زیادی سبب جداسازی شماری از ریزجانداران شده‌اند که توانایی تجزیه ترکیب‌های نیتروآروماتیک به روش هوازی یا بی‌هوازی را دارند (ر.ک: کول‌کارنی و چادهاری، ۲۰۰۷).

---

1. *ostreatus*
2. Nitroso

مسیرهای بی‌هوازی معمولاً سبب تشکیل آمین‌های آروماتیک از طریق یک ساز و کار انتقال ۶- الکترونی می‌شوند، در حالی‌که مسیرهای هوازی مونو- یا دی‌اکسیژنازها را برای حذف گروه‌های نیترو از مونو-نیتروفنول‌ها به کار می‌برند که نمونه آن بیش از ۵۰ سال پیش در *سودوموناس*‌ها نشان داده شده است. این باکتری‌ها می‌توانند ۴- نیتروفنول را به هیدروکوئینون تبدیل کرده و نیتریت آزاد کنند (سیمپسون و ایوانز، ۱۹۵۳). البته باکتری‌هایی که از نیترو- آروماتیک‌ها به عنوان تنها منبع کربن و یا نیتروژن استفاده می‌کنند، بسیار نادر هستند (بنت و همکاران، ۱۹۹۵). قارچ‌های پوسیدگی سفید چون دارای سیستم‌های آنزیمی اکسیداتیو مناسب هستند، می‌توانند TNT را تجزیه و به CO_2 معدنی کنند (پوینتینگ، ۲۰۰۱). *فانروکت کرایزوسپوریوم* قارچ انتخابی در این گونه پژوهش‌ها بوده (هادسون و همکاران، ۲۰۰۰؛ جکسون و همکاران، ۱۹۹۹؛ بای‌من و رادکار، ۱۹۹۷) و مشارکت سیستم آنزیمی تجزیه کننده لیگنین هم با استفاده از MnP خالص تایید شده است (ون‌آکن و همکاران، ۱۹۹۹). افزودن جاذب توئین[1] ۸۰ به محیط کشت *پی. کرایزوسپوریوم* معدنی‌شدن TNT را دو برابر افزایش داد (تا ۲۹/۳ درصد در بیش از ۲۴ روز) و جهش‌زایی ضایعات TNT محلول را تا ۹۴ درصد کاهش داد که با استفاده از روش زیست‌سنجی میکروزوم *سالمونلا* اندازه‌گیری شد (دُنلی و همکاران، ۱۹۹۷). معدنی شدن توسط *پی. کرایزوسپوریوم* برای نیتروگلیسرین نیز در کشت مخلوط با باکتری‌ها ثابت شده است. البته نشان داده شد که معدنی‌شدن بی‌هوازی به وسیله باکتری‌ها با سرعت بیشتری رخ می‌دهد (بایومیک و همکاران، ۱۹۹۷). دیده شده است که در تجزیه TNT، لاکازها با تسریع اتصال متابولیت‌های TNT کاهش یافته به ماتریس آلی خاک، سبب سمیت‌زدایی بقایای انفجاری آن می‌شوند (بررسی شده به وسیله دوران و همکاران، ۲۰۰۰). اخیراً، نیان‌هونگو و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که لاکاز قارچ *ترامتس مودستا*[2] در ناپویا کردن فرآورده‌های تجزیه TNT نقش دارد.

تلاش‌هایی که برای پالایش خاک در راستای حذف نیترو- آروماتیک‌ها صورت گرفته عمدتاً در مقیاس آزمایشگاهی بوده و در آن‌ها بیشتر از فن‌آوری‌های سوسپانسیون خاک (دوغاب خاک) استفاده شده است (کیولکارنی و چایوداری، ۲۰۰۷). سوسپانسیون شامل راکتورهای پر شده با مخلوطی از خاک و آب هستند که در صورت نیاز سوبستراهای همراه و مواد غذایی می‌توانند به آن افزوده شوند. دو روش متفاوت برای زیست‌پالایی TNT در راکتورهای دوغابی وجود دارد: معدنی‌شدن مواد منفجره به عنوان هدف اصلی، و اتصال برگشت‌ناپذیر متابولیت‌های TNT به ماتریکس خاک (استیو- نومز و همکاران، ۲۰۰۱). فرایندی با عنوان SABRE[3] (پالایش زیستی

1. Tween-80
2. *modesta*
3. Sequential anaerobic biological remediation ex situ

بی‌هوازی متوالی خارج از محل)، در دانشگاه آیداهو[1] توسعه یافته و ثبت شده است که شامل مجموعه‌ای از جانداران بی‌هوازی اختیاری شامل گونه‌هایی از جنس *کلاستریدیوم* است که مواد منفجره‌ای مانند TNT را به مواد غیرسمی، غیرآروماتیک و فرآورده‌هایی که به شکل هوازی قابل معدنی شدن باشند، دگرگون می‌کند (فانک و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین، گزارش شده است که قارچ *پی. کرایزوسپوریوم* هم می‌تواند TNT موجود در خاک را تا سطح حدود ۱۰۰۰۰ppm معدنی‌کند (فرناندو و همکاران، ۱۹۹۰). اگرچه، انباشت مواد نشاسته‌ای در خاک پالایش شده نیاز اکسیژنی بالایی را ایجاد می‌کند، که ممکن است در زمان مرطوب شدن خاک‌های کشاورزی پس از آبیاری یا بارندگی به دلیل توسعه سریع شرایط بی‌هوازی، زیان‌آور باشد. افزون بر این، مجموعه‌ی باکتریایی و قارچی که برای تجزیه به کار گرفته شده‌اند هم تحت تاثیر شرایط زیر قرار می گیرند: (۱) زنده‌مانی ماده تلقیحی به سبب سمیت مواد شیمیایی دشوار است، (۲) کاهش مقدار ماده شیمیایی محدود می‌شود، (۳) حضور فلزهای سنگین پالایش را محدود می‌کند. به منظور غلبه بر این محدودیت‌ها، از روش غیرپویا کردن ریزجانداران تجزیه کننده یا آنزیم‌ها با موفقیت استفاده شده است (آلکساندر، ۱۹۹۹؛ کیولکارنی و چایوداری، ۲۰۰۷).

۷-۳-۳-۲- ترکیب‌های فنولی مختل کننده غدد درون‌ریز

به تازگی توجه علمی و عمومی به برخی از مواد شیمیایی شبه هورمون متمرکز شده که در محیط وجود دارند و پیامدهای بالقوه بر حیات وحش و سلامت انسان دارند. این مواد شیمیایی، به عنوان مواد شیمیایی مختل کننده غدد درون‌ریز[2] (EDC ها) (بیشتر قسمت‌های بدن انسان) شناخته شده‌اند. زیرا آن‌ها در عمل‌کرد سیستم درون‌ریز به ویژه در فرایند رشد و تولید مثل اختلال ایجاد کرده و آسیب‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند. در سال ۲۰۰۱، قرارداد استکهلم[3] تحت حمایت برنامه محیط زیست سازمان ملل متحد[4] فهرستی از مواد شیمیایی مختل کننده‌ی غدد درون‌ریز احتمالی در محیط زیست را مشخص کرد، که برخی آفت‌کش‌ها، فتالات‌ها، استروژن‌های گیاهی و چندین ترکیب فنولی را شامل می‌شود (برنامه محیط زیست سازمان ملل متحد، ۲۰۰۱).

چنین نگرانی‌هایی نیاز به روش‌های زیست‌پالایی پیشرفته برای حذف کارآمد این ترکیب‌ها از انواع محیط‌های آلوده شامل آب، رسوبات، لجن استفاده شده برای حاصل‌خیزی خاک‌های کشاورزی و خاک‌ها را تشدید کرده است (دوران و اسپوزیتو، ۲۰۰۰؛ رومانتسوک و همکاران، ۲۰۰۰).

---

1. University of Idaho
2. Endocrine disruptor chemicals
3. Stockholm Convention
4. United Nation Environmental Program

دگرگونی آنزیمی EDC ها توسط آنزیم‌های اکسیداتیو قارچ‌های تجزیه‌کننده لیگنین اساساً روی دو خانواده متمرکز می‌شود: (۱) آلکیل‌فنول‌ها مانند نونیل‌فنول[1] و اُکتیل‌فنول[2]، و (۲) بی‌فنیل‌ها مانند بی‌فنیل متان، که به عنوان بیسفنول اِی[3] شناخته می‌شود و معمولاً به عنوان ترکیب مدل در مطالعه مختل کننده‌های غدد به کار می‌رود. بیسفنول اِی یک ماده منحصر به فرد است که اساساً در تولید رزین‌های اپوکسی و پلاستیک‌های پلی‌کربنات مورد استفاده قرار می‌گیرد. از دومی در بسته‌بندی غذا و نوشیدنی‌ها و از اولی به عنوان لاک‌های پوشش دهنده فلزها در قوطی‌های کنسرو و لوله‌های آب استفاده می‌شود. با توجه به این‌که آن‌ها مشتقات فنلی هستند، به راحتی به وسیله لاکازهای قارچی دگرگون می‌شوند که در چندین مقاله گزارش شده است (تاناکا و همکاران، ۲۰۰۱؛ تسوستومی و همکاران، ۲۰۰۱؛ سایتو و همکاران، ۲۰۰۴). به عنوان مثال، گزارش شده است که نونیل‌فنول، اُکتیل‌فنول، بی‌فنول اِی و اتینیل‌استرادیول[4] (استروژن مصنوعی) که روی شن دریا جذب سطحی شده بودند ($2\ pmol\ g^{-1}$) به وسیله لاکاز *تی. ورسیکالر* در pH بهینه‌ی ۵ دگرگون شدند. نویسندگان پیشنهاد کردند که EDC فنولی ممکن است از طریق تبدیل آنزیمی به رادیکال‌های فنوکسی پلیمره تبدیل شوند. گروه ما (دوبروکا و همکاران، ۲۰۰۵) به تازگی نشان دادند که بازیدیومایست تجزیه کننده لیگنین *تی. ورسیکالر* توانست تا اندازه‌ای تبدیل نونیل‌فنول به دی‌اکسید کربن را تسریع کند، و لاکازهای خالص‌سازی شده از محیط کشت این قارچ در اتصال اکسیداتیو نونیل‌فنول درگیر شدند، که منجر به اولیگومر شدن نونیل‌فنول از طریق تشکیل پیوندهای C-C شد.

اخیراً، دیانو و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که لاکاز *تی. ورسیکالر* که روی غشای نایلونی تثبیت شده بود توانست بیسفنول اِی را به طور کارآمدی دگرگون کند و ثابت شد که مقادیر بالای درصد فعالیت آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های پایین سوبسترا بود. با توجه به حلالیت آبی پایین این ترکیب‌ها، به نظر می‌رسد که در واقعیت این غلظت‌های پایین در آب‌های آلوده وجود داشته باشند.

۷-۳-۴- مهندسی اکسیدازهای قارچی

شمار زیادی از کارهای ذکر شده در بالا نشان می‌دهد که لاکازهای قارچی می‌توانند ابزاری کارآمد برای فرایندهای زیستی باشند، که سبب پاک‌سازی آب آلوده (جولی‌والت و همکاران، ۲۰۰۰) و زیست‌پالایی خاک می‌شوند (راما و همکاران، ۲۰۰۱). با این وجود، دگرگونی زیستی ترکیب‌های

1. Nonylphenol
2. Octylphenol
3. Bisphenol A
4. Ethynylestradiol

زیست‌بیگانه از طریق لاکاز در محیط‌های طبیعی دچار برخی از محدودیت‌های آنزیمی است: (۱) پتانسیل رداکس (تا کنون، در محدوده (۰/۸ – ۰/۴ ولت) پایین‌تر از چیزی است که برای دگرگونی ترکیب آلی هدف نیاز است، (۲) pH اسیدی مناسب برای فعالیت که در مقایسه با pH پساب‌ها یا خاک‌ها بسیار پایین است و (۳) نیاز به واسطه رداکس، برای زمانی‌که سوبسترای کاهنده برای قرار گرفتن در درون جایگاه T1 فعال بسیار بزرگ است.

مهندسی لاکازها برای چیرگی بر چنین کاستی‌هایی رویکردی نویدبخش به نظر می‌رسد و تلاش‌های مختلفی برای بهبود ویژگی‌های لاکازها (یا دیگر آنزیم‌هایی که پتانسیل استفاده در فرایندهای زیست‌پالایی را دارند) با کاربرد فناوری‌های زیست مولکولی گزارش شده است (لیو و همکاران، ۲۰۰۵). دو روش متفاوت و مکمل در این زمینه گزارش شده است: یک روش بنیادی که مبتنی بر ساختار پروتئین است، یعنی طراحی آزمایش‌هایی که در ساختار جایگاه پذیرنده آنزیم جهش ایجاد کند، و دوم روش‌های (جهش‌زایی) تصادفی‌تر که در راستای تکامل هستند.

پژوهش پیشگامِ زو و همکاران (۱۹۹۶) و زو (۱۹۹۹) پیشنهاد کرد که تری‌پپتید غیر-پیوندی که در مجاورت جایگاه فعال آنزیم است، در مقدار پتانسیل رداکس نقش دارد. این پژوهش‌ها بر اساس ترتیب توالی‌ها انجام شد و بدون اطلاع دقیق از شکل هندسی فضایی سوبسترا یا برهم‌کنش بین اسیدهای آمینه و سوبسترا بود. جهش سه‌گانه در ترتیب توالی، اگرچه سبب تغییر چشم‌گیر پتانسیل رداکس نشد، اما فعالیت فنول‌اکسیدازی نشان داد، pH بهینه را یک واحد پایین‌تر یا بالاتر برد و پارامترهای سینتیکی را به شدت تغییر داد. نتایج به عنوان اختلالات ساختاری احتمالی ناشی از جهش در تشخیص مولکولی بین سوبسترای کاهنده و آنزیم تفسیر شدند. در ۲۰۰۲ برای نخستین بار، ساختار سه بعدی لاکازهای *تی. ورسیکالر* (برتراند و همکاران، ۲۰۰۲؛ پیون‌تک و همکاران، ۲۰۰۲)، *پی. سینابارینوس*[1] (آنتورینی و همکاران، ۲۰۰۲)، و *ام. آلبومایسس*[2] (هاکولینن و همکاران، ۲۰۰۲) با یون‌های مس مکمل ارائه شدند. افزون بر این، دو مورد از ساختار این لاکازها در حضور یک سوبسترای کاهنده به دست آمد (برتراند و همکاران، ۲۰۰۲؛ انگیتا و همکاران، ۲۰۰۳). گروه ما نشان داد که حضور یک آریل‌آمین (۲، ۵- دی‌متیل بنزن‌آمین یا ۲، ۵- زایلیدین) در جایگاه فعال T1 آنزیم، دو بقایای مهم برای برهم‌کنش بین گروه آمینوی سوبسترای کاهنده و آنزیم را آشکار کرد. به طور خاص، Asp 206 از طریق پایانه اکسیژن زنجیره جانبی خود با گروه آمینوی ۲، ۵- زایلیدین پیوند هیدروژنی برقرار کرد. افزون بر این، آنالیز وابستگی پارامترهای سینتیکی به pH پیشنهاد می‌کند که ممکن است بقایای اسیدی در پیوند با ترکیب‌های فنولیک

1. *cinnabarinus*
2. *albomyces*

نقش داشــته باشــد. آزمایش جهش‌زایی برای Asp 206 در مخمر *یاروویا لیپولا یتیکا*[1] انجام شــده اســت (مدزک و همکاران، ۲۰۰۶). دیده شــد که ســرعت دگرگونی ســوبســترای مشــترک در سویه جهش یافته Asp206 و عادی نزدیک به هم بود. هرچند که در تجزیه ABTS به عنوان ســوبسترا، K_{cat} در کارآمدترین ســویه جهش‌یافته Asp206Al نسبت به سویه عادی سه برابر افزایش یافت. با این وجود، جهش Asp ســـبب تغییر چشـــم‌گیر pH (pH=۱/۴) برای فعالیت بهینه در برابر ۶،۲-دی‌متوکسی‌فنول شد.

مهندسی لاکاز با تکامل آزمایشگاهی هم نتایج جالبی را نشان داد که توسط گروه بالِستِروس[2] و در بیان عملکرد لاکاز گرمادوست در *ساکارومایسس سرِویسیه*[3] گزارش شده است (بولتر و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به حلالیت آبی پایین برخی از ترکیب‌های زیست‌بیگانه مانند PAH ها ممکن است نیاز به افزودن حلال‌های آلی به منظور کاهش محدودیت‌های انتقال جرم باشد. در حالی‌که مشخص شده است که لاکازها در چنین شرایطی نسبتاً ناپایدار هستند. یک لاکاز گرمادوست با روش (تکامل مستقیم) در محیط آزمایشگاهی راه‌اندازی شد تا در حضور غلظت‌های افزایشی استونیتریل و اتانول بســیار فعال و پایدار باشد. پس از تنها یک نسل، سویه جهش یافته در حضور ۲۰ درصد استونیتریل یا ۳۰ درصــد اتانول، افزایش فعالیت حدود ۳/۵ برابر در مقایســه با ســویه والد را نشــان داد (آلکاد و همکــاران، ۲۰۰۵). لاکــازهــای جهش یــافتــه برای اکســـایش آنتراســـن در حضـــور ۲۰ درصـــد (حجمی/حجمی) استونیتریل هم آزمایش شدند (زوماراگا و همکارن، ۲۰۰۷)

تلاش جالب دیگر در مهندسی لاکاز افزایش بیان آنزیم در سیستم‌های نوترکیب است، که مورد مهم در کاربرد آنزیم‌های بهینه شده در فرایندهای زیست‌پالایی است. تکامل مستقیم جهت‌دار لاکاز *مایسلیوفتورا ترموفیلیا*[4] (MtL) که به صورت عمل‌کردی در *ساکارومایسس سرویسیه* بیان شده بود، بیان این آنزیم را هشــت برابر افزایش داد که بالاترین سطح گزارش شده برای لاکاز در مخمر (mg l^{-1} ۱۸) در آن زمان بود. فعالیت‌های ویژه ســویه جهش یافتهMtL روی ABTS و ســیرینگالدازین[5] نشــان داد که تمایل به ســوبسترا (یا اختصاصی بودن) با جهش‌های اعمال شده تغییر نکرد (بولتر و همکاران، ۲۰۰۳).

اخیراً در پژوهشــی جهش تصــادفی انجام شــد که سبب افزایش بیان ژن لاکاز *تی. ورسیکالر* در مخمر *پیچیا پاســتوریس*[6] شد. بنابراین، عملکرد آنزیم به mg l^{-1} ۱۴۴ رسید یعنی ۳/۷ برابر افزایش

---

1. *Yarrowia lipolytica*
2. Ballesteros
3. *Saccharomyces cerevisiae*
4. *Myceliophthora thermophila*
5. Syringaldazine
6. *Pichia pastoris*

یـافت و همچنین K_{cat} افزایش ۱/۴ برابری داشـــت. ویژگی آنزیمی ســـویه جهش یافته (K_M برای ABTS و گایاکول[1]، پایداری حرارتی و pH، pH بهینه) در مقایســـه با نوع بدون جهش تغییر نکرد (هو و همکاران، ۲۰۰۷).

۷-۳-۵- مزایای استفاده از آنزیم‌ها در زیست‌پالایی خاک

مثال‌های فوق توانایی اکسیدازهای برون یاخته‌ای قارچ‌های پوسیدگی سفید در زیست‌پالایی شماری از آلاینده‌های آروماتیک را نشـان می‌دهد. حتی اگر حذف کامل این ترکیب‌ها (یعنی معدنی شـدن آن‌ها)، به فعالیت اضـافی‌تر (بیشـتر) آنزیم‌های درون یاخته‌ای این قارچ‌ها یا دیگر ریزجانداران بومی خاک وابسـته باشـد و نیازمندِ حضور همه یاخته‌ها و مسیرهای متابولیک آن‌ها باشد، بازهم می‌توان گفت که آغاز زیسـت‌پالایی آلاینده به وسـیله این اکسیدازها بوده است. بنابراین، استفاده از آنزیم‌ها بدون یاخته می‌تواند با تسـریع فاز اولیه تجزیه بر مشـکل زیسـت‌پالایی (یعنی سرعت تجزیه پایین) غلبه کند. آلاینده، توسـط واکنش آنزیمی به یک رادیکال بسـیار فعال دگرگون می‌شـود و احتمال دارد با دیگر گونه‌های گیرنده الکترون[2] در خاک واکنش دهد. این واکنش‌ها سـبب تشـکیل بقایا از طریق پیوند با مواد هیومیک خاک می‌شـود. فرایندی که مشـابه سـاخت اسید هیومیک در خاک‌ها اسـت. در این مورد، تجزیه آلاینده ناقص اسـت زیرا معدنی شـدن اتفاق نمی‌افتد، اما محصول ناپویا شده زیست فراهمی کمتری دارد و بنابراین سمیت آن کاهش یافته است (بُلاگ، ۱۹۹۲). همان‌طور که توسـط پژوهش‌گران زیادی اشاره شده است (جیانفردا و رادو، ۲۰۰۴؛ پوینتینگ، ۲۰۰۱؛ آلکاد و همکاران، ۲۰۰۵؛ ریوگابر و تالی، ۲۰۰۶؛ کول‌کارنی و چایوداری، ۲۰۰۷)، استفاده از آنزیم‌ها به جای ریزجانداران بدون شک از دیدگاه زیست محیطی، مهندسی و اقتصادی دارای مزایایی است. استفاده از آنزیم بر برخی محدودیت‌های ریزجانداران غلبه می‌کند.

- حسـاسـیت آنزیمی به تغییرات غلظت آلاینده پایین اسـت: غلظت بالای آلاینده ممکن است برای یاخته سـمی باشد، بنابراین کارایی تجزیه را کاهش می‌دهد. اما غلظت پایین آلاینده هم ممکن اسـت پیامد منفی بر بیان سـیسـتم آنزیمی ریزجاندار داشته باشد. به ویژه اگر این امر در ارتباط با ساز و کار ثانویه ریزجانداران باشد.
- آنزیم‌ها در دامنه وسـیعی از شـرایط فیزیکی - شـیمیایی (درجه حرارت، pH و شـوری) در ماتریکس محیط فعال هستند. این شرایط در بیشتر موارد برای یاخته‌های میکروبی فعال، نامطلوب هسـتند. همچنین حضـور مواد سمی یا بازدارنده‌های متابولیسم میکروبی نیز بر میکروب‌ها پیامد منفی دارند.

---

1. Guaiacol
2. Nucleophilic

- واکنش دگرگونی زیستی می‌تواند به گونه‌ای انتخاب شود تا فرآورده‌ی سمی تولید نکند، چیزی که در بیشتر موارد مرتبط با فرایندهای شیمیایی و برخی فرایندهای میکروبیولوژیکی دیده می‌شود.
- نیاز به افزایش دسترسی زیستی با وارد کردن حلال‌های آلی همراه یا سورفکتنت‌ها برای آنزیم‌ها کاربردی‌تر از انجام این کار برای یاخته‌ها است.
- کنترل پیامد زیست‌بوم در مزرعه وقتی که از آنزیم استفاده شود، آسان است: در استفاده از میکروب‌ها برای تجزیه کارآمد آلاینده هدف، یاخته‌ها بایستی زنده بمانند، که ممکن است سبب برهم زدن تعادل زیست‌بوم در اکوسیستم (بوم‌سازگان) شود، که استفاده پایدار (مثلاً کشاورزی) از خاک در آینده را با مشکل مواجه می‌کند. در مقایسه با میکروب‌ها، آینده‌ی استفاده از سیستم‌های آنزیمی آزاد بیشتر تحت کنترل است، چراکه آنزیم‌ها پس از انجام عملیات پالایش به وسیله ریزجانداران بومی در همان‌جا، هضم می‌شوند.

افزون بر مزایای استفاده از آنزیم‌ها برای غلبه بر کاستی‌های استفاده از ریزجاندارن، آنزیم‌ها یک سری از مزایای دیگری هم دارند، که اساساً روی گنجایش مهندسی زیست‌مولکولی برای بهبود کارایی آنزیم‌ها در سیستم‌های زیست‌پالایی متمرکز می‌شوند. استفاده از فن‌آوری DNA نوترکیب احتمالاً می‌تواند کاتالیست‌های زیستی اختصاصی، پایدار و بهینه شده با فعالیت واکنش بالا برای آلاینده‌های مقاوم، در مقیاس بالا و با هزینه‌های پایین تولید کند. البته، ریزجانداران مهندسی ژنتیکی شده[1] (GEM ها) با توانایی‌های پیشرفته هم با استفاده از همین فن‌آوری قابل تولید هستند، اما کاربرد GEM ها هنوز هم با محدودیت‌های قابل توجهی روبرو است. برای جلوگیری از انتشار عناصر ژنتیکی متحرک نامطلوب مانند پلاسمید نوترکیب دارای نشان‌گرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، رهاسازی GEM ها به محیط زیست به شدت کنترل می‌شود. در سوی دیگر، سیستم‌های آنزیمی خالص پیامد زیست محیطی اندکی در خاک دارند. چراکه طول عمر کم آن‌ها کم است و آنزیم‌ها پس از کاربردشان به سرعت در محل توسط ریزجاندارن بومی هضم می‌شوند (آحِن و همکاران، ۲۰۰۲).

با این حال، تعداد گزارش‌های منتشر شده‌ی مرتبط با پالایش آنزیمی خاک کم است که دلیل آن دشواری خالص‌سازی و هزینه آنزیم‌هاست. یک نمونه نادر، پالایش خاک آلوده به ۲، ۴-دی‌کلروفنول به وسیله آنزیم لاکاز است (آحِن و همکاران، ۲۰۰۲). نویسندگان کارایی لاکاز ناپویا شده و آزاد را مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که با توجه به هزینه ناپویا شدن و از دست دادن فعالیت آنزیم در فرایند ناپویا شدن، مزیت آنزیم ناپویا شده بسیار کم است. بنابراین، به نظر

1. Genetically engineered microorganisms

می‌رسد که استفاده از لاکاز *تی. ویلوسا*[1] برای پالایش خاک گزینه عملی‌تری است. اگر این نتیجه‌گیری بتواند به دیگر آنزیم‌ها و کاربردهای بیشتر بسط داده شود، استفاده از آنزیم‌ها برای فرایند پالایشی جذاب‌تر خواهد شد.

۷-۳-۶- محدودیت‌های استفاده از آنزیم‌ها برای زیست‌پالایی خاک

استفاده از آنزیم‌های قارچی در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده مستلزم ارزیابی دقیق فعالیت آنزیم‌ها در خاک است. تنوع ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی خاک و ویژگی‌های سطحی آنزیم‌ها درک فرایندِ درگیر در برهم‌کنش بین این دو سطح را مشکل می‌کند. خاک محیطی فیزیکی متشکل از خاکدانه‌ها است (بریور، ۱۹۶۴) که میزبان رخ‌دادهای زیستی و جریان آب، هوا و ماده، در سطوح مختلف است. برای بهینه‌سازی فن‌آوری زیست‌پالایی در خاک‌ها، لازم است که این پیچیدگی‌ها، به ویژه با شناخت و مدیریت فرایندهای مکانی مختلف که در خاک‌ها رخ می‌دهند (مانند تثبیت آلاینده‌ها، جذب سطحی آنزیم‌ها و غیره) شناسایی شده و مورد توجه قرار گیرند. با توجه به پیچیدگی و ناهمگنی (غیریکنواختی) خاک‌ها، مدل‌سازی وضعیت ترمودینامیک محیط خاک ابزاری مناسب برای نظارت بر کارایی فناوری‌های زیست‌پالایی مبتنی بر آنزیم است. این مدل‌سازی بدون توصیف دقیق ساختمان خاک و وضعیت ترمودینامیکی برهم‌کنش خاک- آب در ساختمان خاک امکان‌پذیر نیست. به تازگی الگوی جدیدی ارائه شده است که مبتنی بر ویژگی‌های کیفی ساختمان و اقلیم خاک است. این الگو با نظر به شناسایی برهم‌کنش خاک- آنزیم، پُلی بین خاک‌شناسی و فیزیک خاک ایجاد می‌کند و بهینه‌سازی استفاده از آنزیم‌های برون یاخته‌ایی در برنامه‌های زیست‌پالایی را امکان‌پذیر می‌سازد (برایودا و موهتار، ۲۰۰۴، ۲۰۰۹).

بنابراین، استفاده از آنزیم‌ها برای پالایش خاک‌های آلوده به دانش بیشتری در مورد پیامدهای شرایط زیست محیطی بر زنده‌مانی و انتشار قارچ‌ها و رفتار و فعالیت آنزیمی نیازمند است. موارد زیادی به عنوان عوامل محدود کننده‌ی انجام زیست‌پالایی در خاک‌های آلوده به آلاینده‌های آلی شناسایی شده‌اند.

۷-۳-۶-۱- غیریکنواختی (ناهمگنی) و دسترسی به آلاینده‌ها در محیط خاک

آلودگی خاک با آلاینده‌های آلی اغلب با غلظت‌های بالا از فلزهای سنگین مانند سرب و جیوه همراه است. این مخلوط آلاینده‌ها پیامدهای منفی زیادی بر زنده‌مانی قارچ‌ها و فلور میکروبی خاک

1. *villosa*

(بلدرین و گابریل، ۱۹۹۷؛ بلدرین و همکاران، ۱۹۹۶؛ بوگان و لامار، ۱۹۹۶)، فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه بر اثربخشی زیست‌پالایی در خاک‌ها دارد.

شمار زیادی از سورفکتنت‌های یونی و غیریونی و امولسیون‌کننده‌ها ممکن است جزءبندی آلاینده‌ها از فاز جامد خاک به فاز آبی را تسهیل کنند. پژوهش‌های زیادی در این رابطه برای سال‌های متمادی انجام شده است (رید و همکاران، ۲۰۰۰). سورفکتنت‌های کلاسیک مصنوعی و سورفکتنت‌های زیستی به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بنابراین، تعدادی از ریزجانداران تجزیه کننده هیدروکربن‌ها عوامل امولسیون‌کننده برون یاخته‌ای تولید می‌کنند، که تماس بین آن‌ها و هیدروکربن‌ها را افزایش می‌دهد. اگرچه، جلوگیری از دگرگونی آلاینده بیشتر در مواقعی گزارش شده که سورفکتنت‌ها حضور داشتند. سمیت سورفکتنت و یا استفاده ترجیحی از سورفکتنت به عنوان یک سوبسترای رشد، فرایندهایی هستند که به عنوان عوامل بازدارنده‌ی تجزیه میکروبی وابسته به سوبسترا (بیشتر در سطوح بالای cmc[1]) پیشنهاد شده‌اند (موگین، ۲۰۰۲).

۷-۳-۶-۲- رفتار آنزیم‌ها در محیط خاک

خاک محیطی متخلخل است که با سطوح بالای مشترک بین فازهای جامد، مایع و گاز توصیف می‌شود. وضعیت ترمودینامیکی محیط آبیِ خاک به نام اقلیم خاک، که شرایط فیزیکی مکانی را تشکیل می‌دهد، فرایندهای زیست‌زمین‌شیمیایی خاک و در پی آن برهم‌کنش بین آنزیم‌ها و محیط خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد (برایودا و موهتار، ۲۰۰۹). در سوی دیگر، کانی‌های رسی خاک ویژگی‌های جذب سطحی بالایی دارند که مستقیماً بر برهم‌کنش آنزیم‌ها با سطوح فیزیکی اثر گذار است (جیان‌فِردا و همکاران، ۱۹۹۱؛ رامیرز- مارتینز و مَک‌لارن، ۱۹۶۶). تمایل شدید آنزیم‌ها به سطوح مشترک جامد- مایع و مایع- گاز سبب برهم‌کنش‌های مکرر این پروتئین‌ها با سطوح خاک می‌شود. تغییرپذیری بالای ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی و ساختارهای مونومری آنزیم سبب می‌شود که گنجایش جذب سطحی آن‌ها در مقایسه با قندها یا اسیدهای نوکلئیک نسبتاً بالا باشد. ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی خاک پیامد مستقیم بر شدت جذب سطحی آنزیم‌ها و کمیت پروتئین‌های جذب سطحی شده دارد. پژوهش‌های زیادی نقش آرایش پروتئین را بر ویژگی‌های جذب سطحی آن‌ها برجسته کرده‌اند. در واقع، آرایش ساختاری پروتئین‌ها در سطوح خاک پیامد متفاوتی دارد، چراکه سبب افزایش انتروپی سیستم شده و هم‌زمان سبب افزایش سطح ویژه مشترک در ناحیه تماس بین آنزیم‌ها و خاک می‌شود (کیوکامپویز، ۱۹۸۷؛ ساندویچ و شِری، ۱۹۸۸). جذب سطحی آنزیم‌ها روی سطوح خاک ناشی از برهم‌کنش نیروهای آب‌گریز و

1. Supra-cmc

الکترواستاتیک است (نورد، ۱۹۸۶؛ استونتون و کیوکامپویز، ۱۹۹۴). این نیروها مستقیماً بر فعالیت آنزیم‌ها و در پی آن بر تجزیه ترکیب‌های زیست‌بیگانه و چرخه زیست‌زمین‌شیمیایی عناصر اصلی مانند کربن، نیتروژن و فسفر در خاک‌ها تاثیر می‌گذارند. آنزیم‌های برون یاخته‌ای تجزیه کننده‌ی لیگنین، هم کاتالیست بیوشیمیایی هستند و هم منبع عنصر مهم نیتروژن در چرخه نیتروژن خاک هستند. بنابراین در معرض تجزیه زیستی قرار دارند (کیوکامپویز، ۲۰۰۰؛ کیوکامپویز و همکاران، ۱۹۹۵). در واقع، برهم‌کنش آنزیم‌ها با سطوح جامد نه تنها پیامد چشم‌گیری بر فعالیت آن‌ها دارد، بلکه بر تجزیه آن‌ها نیز موثر است. برهم‌کنش آنزیم‌ها با سطوح خاک، به ویژه کانی‌های رسی، می‌تواند بر فعالیت آنزیم اثر گذار باشد. مهم‌ترین پیامد این برهم‌کنش، تغییر pH بهینه فعالیت آنزیم‌های جذب سطحی شده روی سطوح دارای بار الکتریکی است (مَک‌لارن، ۱۹۵۴؛ مَک‌لارن و همکاران، ۱۹۵۸). به عبارت دیگر، جذب سطحی آنزیم‌ها اغلب سبب کاهش سرعت واکنش آنزیم و فعالیت متابولیکی آن می‌شود (جیان‌فِردا و همکاران، ۱۹۹۱؛ رامیرز- مارتینز و مَک‌لارن، ۱۹۶۶). پیامدهای منفی غیرقابل برگشت جذب سطحی آنزیم‌ها بر فعالیت متابولیکی آن‌ها دیده شده و به نظر می‌رسد که مرتبط با تغییر در pH فعالیت پروتئین جذب سطحی شده باشد (کیوکامپویز، ۱۹۸۷). فرایندهایی برای برهم‌کنش آنزیم‌ها با سطوح کانی فرض شده‌اند. تغییر در ریزمحیط آنزیم، مانند تغییر pH مکانی یا غلظت یون، و اصلاح آرایش پروتئین می‌توانند از جمله این فرایندها باشند (کیوکامپویز، ۲۰۰۰).

پیامدهای pH بر برهم‌کنش پروتئین‌ها با سطوح خاک به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. بسیاری از مشاهده‌ها نشان می‌دهند که بیشترین جذب سطحی یک پروتئین روی یک سطح باردار الکتریکی اغلب در اطراف pI پروتئین رخ می‌دهد (هینس و نورد، ۱۹۹۴؛ مَک‌لارن و همکاران، ۱۹۵۸؛ نورد، ۱۹۸۶). حضور ماده آلی در خاک‌ها همچنین با کاهش جذب سطحی آنزیم‌ها روی سطوح رس پیامد محافظتی روی فعالیت آنزیم‌ها دارد. پژوهش‌های تجربی نشان داده است که تخریب ماده آلی مقادیر آنزیم‌های جذب سطحی شده را افزایش می‌دهد، و در نتیجه فعالیت پروتئین را کاهش می‌دهد (کیوکامپویز و همکاران، ۱۹۹۵). بنابراین، ترکیب آلی خاک‌های آلوده بایستی ارزیابی و مدیریت شود تا از فعالیت‌های مطلوب آنزیم‌های قارچی مورد استفاده در برنامه‌های زیست‌پالایی اطمینان حاصل شود. ویژگی‌های آب‌گریز/ آب‌دوست خاک‌ها نیز در برهم‌کنش پروتئین‌ها و خاک‌ها و آرایش ساختاری آنزیمی نقش دارند. این ویژگی‌ها بر اساس ترکیب مواد معدنی خاک‌ها تغییر می‌کند.

۷-۳-۶-۳- تولید اکسیدازهای قارچی

محدودیت مهم دیگر استفاده از آنزیم‌ها در فرایندهای پالایش محیط زیست قابلیت دسترسی به آنزیم است، که به مقدار و هزینه آنزیم وابسته است. پژوهش‌های زیادی برای تعیین شرایط مناسب برای تولید لاکاز توسط قارچ‌ها انجام شده است (تاوارس و همکاران، ۲۰۰۵؛ آیکی‌هاتا و همکارن، ۲۰۰۴؛ کارامِن و گوردال، ۲۰۰۲؛ پوینتینگ و همکاران، ۲۰۰۰).

قارچ‌های رشته‌ای می‌توانند در حدود $20\text{-}50\ mg\ l^{-1}$ لاکاز تولید کنند اما، در حال حاضر یک سیستم تولید کارآمد در مقیاس راکتور زیستی برای آن وجود ندارد و بایستی بر کاستی‌های زیادی، مانند رشد کنترل نشده قارچ، تشکیل پلی‌ساکاریدها در پیرامون رشته‌های قارچی و ترشح پروتئازهایی که لاکازها را غیرفعال می‌کنند، غلبه کرد (رودریگز-کوتو و توکا- هِررا، ۲۰۰۷). افزودن تحریک کننده‌هایی مانند زایلیدین (مینیوسی و همکارن، ۲۰۰۷) یا متابولیت‌های آن (کوتو و همکاران، ۲۰۰۲؛ موگین و همکاران، ۲۰۰۲؛ کُلمن و همکاران، ۲۰۰۵)، گایاکول (ریان و همکاران، ۲۰۰۷) برای *تی. ورسیکالر* و مس برای قارچ‌های پوسیدگی سفید *پلیوروتوس اُستریاتوس* (پالمیری و همکاران، ۲۰۰۰)، *ترامتس تروگی*[1] (لِنین و همکاران، ۲۰۰۳) و *تی. ورسیکالر* (تاوارس و همکاران، ۲۰۰۵) تولید لاکاز را به طور چشم‌گیری (ده برابر) در مقایسه با شرایط نبود تحریک کننده افزایش داده‌اند.

یکی دیگر از ابزارهای افزایش فراهمی آنزیم تولید زیادِ آن توسط جانداران نوترکیب است که در آن بازدهی تولید بالا رفته و فرایندهای تولید از نظر اقتصادی به صرفه می‌شود. متاسفانه، بیان اکسیداز قارچ‌های رشته‌ای در سیستم‌های ناهمگن (غیریکنواخت) نسبتاً دشوار است (جولی‌والت و همکاران، ۲۰۰۵) و هنوز بیان زیاد این آنزیم‌ها حاصل نشده است. اگرچه، برخی کارها در این زمینه در حال پیشرفت است.

پراکسیدازها مراحل پیرایش پساترجمه‌ای[2] زیادی دارند که پیوندهای دی‌سولفید، گلیکولیزه شدن O- و N- و همچنین حذف سیگنال پپتید از جمله این مراحل است (کُنسا و همکاران، ۲۰۰۲)، به طوری‌که بیان آن‌ها در *ای. کولای* از طریق شکل‌گیری یک ساختار احاطه کننده پیش می‌رود (ریان و همکاران، ۲۰۰۶). تاکنون، بیان موثر پراکسیدازها در سیستم‌های ناهمگن انجام نشده است، و آن‌ها هنوز هم بایستی از منابع طبیعی گرفته شوند. لاکازهای قارچی هم مانند پراکسیدازها پیرایش پساترجمه‌ای دارند و بیان آن‌ها در یک جاندار غیرمشابه نیازمند استفاده از یک میکروب یوکاریوت است، زیرا به نظر می‌رسد گلیکولیزه شدن که در پایداری لاکازهای قارچی مهم است، تولید لاکاز توسط *ای. کولای* را مختل می‌کند (یوشیتاک و همکاران، ۱۹۹۳). گونه‌های

1. *trogii*
2. Post-translational modifications

آسپرژیلوس[1] می‌توانند پیرایش‌های پساترجمه‌ای را انجام دهند و گلیکولیزه شدن بیش از اندازه[2] را نشان نمی‌دهند، و به همین دلیل به عنوان سیستم بیان برای تولید لاکازها به کار گرفته شده‌اند. البته آن‌ها معمولاً سطوح تولید پایینی را در مقایسه با دیگر پروتئین‌ها نشان می‌دهند (سیگویلوت و همکاران، ۲۰۰۳؛ والکانِن و همکاران، ۲۰۰۳). با این وجود، تولید تجاری لاکاز از *مایسلیوفترا ترموفیلیا* که در *آسپرژیلوس اُریزا*[3] بیان شده توسط شرکت نوو آنزیم[4] انجام شده است. فرایند تولید آنزیم به روش کشت خالص آزمایشگاهی (محیط بسته) انجام شده و لاکاز توسط دولت ایالات متحده به طور کلی بی‌خطر[5] (GRAS) شناخته شده است (سازمان غذا و دارو ایالات متحده، ۲۰۰۳).

مخمرها نیز به سبب توانایی رشد سریع در محیط‌های ساده با تراکم سلولی بالا و هزینه اندک، همراه با سهولت دست‌کاری ژنتیکی این جانداران یوکاریوت، میزبان‌های مناسبی بوده و امکان پیرایش‌های پساترجمه‌ای را دارند. از لحاظ تاریخی، مخمر نانوایی (*ساکارومایسس سرویسیه*) مشهورترین میزبان است، و چندین لاکاز در سطح بیان پایین از آن تولید شده‌اند (کیسکینن و سالوئیمو، ۲۰۰۴؛ کلونُوسکا و همکاران، ۲۰۰۵). مخمر *یاروویا لیپولایتیکا* نیز برای تولید لاکازِ *تی. ورسیکالر* به کار گرفته شده است (جولی‌والت و همکاران، ۲۰۰۵). این موارد به همراه اطلاعات حاصل از برهم‌کنش سوبسترا-آنزیم که از ساختار لاکاز *تی. ورسیکالر* به دست آمد، امکان مهندسی کردن آنزیم با جهش‌زایی در راستای تغییر ساختار را فراهم می‌کند. اگرچه، سطح بیان لاکازها پایین و در حدود $2\ mg\ l^{-1}$ باقی می‌ماند. انتظار می‌رود که با کاربرد ناقل‌های چندکپی[6] و پروموتور ژن[7] قویِ *hp4d* سطح بیان در *یاروویا لیپولایتیکا* ده برابر افزایش یابد.

۷-۴- دورنمای پژوهش‌های آینده

۷-۴-۱-بهبود توانایی آنزیم‌های طبیعی برای دگرگونی آلاینده‌ها

افزایش توانایی سویه‌های گفته شده با بازسازی ژنتیکی، که سبب ایجاد جانداران اصلاح ژنتیکی شده[8] (GMO ها) می‌شود، فرصت‌های امیدوار کننده‌ای را برای گرفتن (استحصال) آنزیم‌هایی با توان متابولیکی بهبود یافته ارائه می‌دهد. این روش‌ها نیازمند آگاهی از ویژگی‌های ساختاری و

1. *Aspergillus*
2. Hyperglycosylation
3. *Oryzae*
4. Novozymes
5. Generally recognized as safe
6. Multi-copy vectors
7. Promoter
8. Genetically modified organisms

متابولیکی آنزیم‌های کلیدی درگیر در متابولیسم آلاینده است که به عنوان مبنایی برای جهت‌دهی تکامل آنزیم‌ها برای رسیدن به کارآمدترین ایزوفرم‌ها باشد. این واقعیت که لاکازها می‌توانند اکسیژن جوی را به عنوان پذیرنده پایانی الکترون استفاده کنند، مزیت قابل‌توجهی برای کاربردهای صنعتی و زیست محیطی آن‌ها در مقایسه با پراکسیدازها که نیاز به تامین مداوم H_2O_2 دارند، است.

با توجه به این واقعیت که مزیت پراکسیدازها پتانسیل رداکس بالای آن‌ها است، مهندسی جایگاه فعال لاکازها برای دست‌یابی به سویه‌های با پتانسیل رداکس بالا، می‌تواند از نظر زیست‌فناوری توجه چشم‌گیری را به خود جلب کند. آگاهی کامل از محیط مولکولی لاکاز نوع یک مس، که به نظر پتانسیل رداکس آنزیم را تنظیم می‌کند، می‌تواند فرصت خوبی در این زمینه باشد (پیونتک و همکاران، ۲۰۰۲). با عملی شدن این کار، دیگر نیازی به واسطه‌های رداکس نخواهد بود.

۷-۴-۲- کشف آنزیم‌ها با توانایی جدید یا افزایش یافته

تاکنون بیشتر آنزیم‌های مورد استفاده در زیست‌فناوری از ریزجانداران غیرسختی‌دوست[1] شناخته شده به دست آمده است. از آن‌جا که ریزجانداران سختی‌دوست برای زنده‌مانی در شرایط محیطی نامناسب سازگار شده‌اند، انتظار می‌رود که آن‌ها حتی در شرایط سخت نیز فعالیت‌های آنزیمی را بیان کنند. هر دو محیط آبی و خاکی از نظر pH، درجه حرارت، شوری یا فعالیت آب می‌توانند محیط نامناسبی باشند. با استفاده از تنوع زیستی طبیعی می‌توان فرایند یافتن آنزیم‌های اجرایی را، در مقایسه با روش‌های پیچیده‌تر و گران‌تر مهندسی تسریع کرد. تا به امروز (طبق اطلاعات ما)، هیچ پراکسیداز و لاکاز قارچی‌ای به این روش شناسایی نشده است. در مقابل، سلولازهای جدید از قارچ رشته‌ای سختی‌دوست *پنی‌سیلیوم سیتریموم*[2] شناسایی و تولید شده است (دوتا و همکاران، ۲۰۰۸).

۷-۵- نتیجه‌گیری

فرایندهای زیستی هنوز هم توجه زیادی را در پالایش خاک‌های آلوده به خود معطوف کرده‌اند. در این زمینه، آنزیم‌ها ابزارهای توان‌مندی به نظر می‌رسند، زیرا آن‌ها راه‌حل‌هایی برای برخی محدودیت‌ها که تمامی جانداران با آن رو به رو می‌شوند را دارند. اکسیدازهای قارچی، مانند پراکسیدازها و لاکازها، به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آن‌ها توانایی زیادی برای دگرگونی (تجزیه یا اتصال) انواع فراوانی از آلاینده‌ها نشان داده‌اند. با این وجود، توانایی آن‌ها در

1. non-extremophilic
2. *citrinum*

محیط‌های کشت مایع دیده شده و در بیشتر موارد هنوز در خاک‌ها اثبات نشده است. به نظر می‌رسد پژوهش‌های آینده مانند غربال‌گری سیستم آنزیمی ریزجانداران سختی‌دوست[1]، فرصت خوبی برای کشف دیگر کاتالیست‌های زیستی قدرتمند ایجاد کند.

1.extremophilic

منابع

Adriansen K, van der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert JV (2004) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. New Phytol 161:549–555.

Adriansen K, Vralstad T, Noben JP, Vangronsveld J, Colpaert JV (2005) Copper-adapted Suillus luteus, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. Appl Environ Microbiol 71:7279–7284.

Ahn MY, Dec J, Kimb JE, Bollag JM (2002) Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. J Environ Qual 31:1509–1515.

Aitken MD (1993) Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. Chem Eng J 52:B49–B58.

Aitken MD, Long TC (2004) Biotransformation, biodegradation, and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Singh A, Ward OP (eds) Biodegradation and bioremediation. Springer, Berlin, pp 83–124.

Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Trends Biotechnol 24:281–287.

Alcalde M, Bulter T, Zumarraga M, Garcia-Arellano H, Mencia M, Plou FJ, Ballesteros A (2005) Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. J Biomol Screen 10:624–631.

Alexander M (1999) Bioremediation technologies: in situ and solid phase. In: Alexander M (ed) Biodegradation and bioremediation. Academic, San Diego, pp 159–176.

Anastasi A, Varese GC, Bosco F, Chimirri F, Marchisio VF (2008) Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. Biores Technol doi:10.1016/j.biotech.2007.12.036.

Anke H, Weber R (2006) White-rot, chlorine and the environment — a tale of many twists. Mycologist 20:83–89.

Antorini M, Herpoel-Gimbert I, Choinowski T, Sigoillot JC, Asther M, Winterhalter K, Piontek K (2002) Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. Biochim Biophys Acta 1594:109–114.

Aust SD (1989) Biodegradation of agrochemicals by use of white rot fungi. In: Hattori T (ed) Recent advances in microbial ecology. Scientific Societies Press, Kyoto, pp 529–533.

Baldrian P (2006) Fungal laccases — occurrence and properties. FEMS Microbiol Rev 30:215–242.

Baldrian P, Gabriel J (1997) Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. Folia Microbiol 42:521–523.

Baldrian P, Gabriel J, Nerud F (1996) Effect of cadmium on the ligninolytic activity of Stereum hirsutum and Phanerochaete chrysosporium. Folia Microbiol 41:363–367.

Barr DP, Aust SD (1994) Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. Environ Sci Technol 28:78A–86A

BASOL (2008) Pollution des sols BASOL. http://basol.environnement. gouv.fr/tableaux/home. htm. Cited 20 April 2008.

Bayman P, Radkar GV (1997) Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by fungi. Int Biodeterior Biodegradation 39:45–53.

Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. FEMS Microbiol Lett 254:173–181.

Bennet JW, Hollrah P, Waterhouse A, Horvarth K (1995) Isolation of bacteria and fungi from TNT-contaminated composts and preparation of 14C-ring labelled TNT. Int Biodeterior Biodegradation 35:421–430.

Bertrand T, Jolivalt C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. Biochemistry 41:7325–7333.

Bhaumik S, Christodoulatos C, Korfiatis GP, Brodman BW (1997) Aerobic and anaerobic biodegradation of nitroglycerin in batch and packed bed bioreactors. Water Sci Technol 36:139–146.

Bodalo A, Gomez JL, Gomez E, Bastida J, Maximo MF (2005) Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. Chemosphere 63:626–632.

Bogan BW, Lamar RT (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbondegrading capabilities of Phanerochaete laevis HHB-1625 and its

extracellular ligninolytic enzymes. Appl Environ Microbiol 62:1597–1603.

Bogan BW, Lamar RT, Burgos WD, Tien M (1999) Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo(alpha) pyrene by Pleurotus ostreatus during growth in PAH-contaminated soils. Lett Appl Microbiol 28:250–254.

Bollag JM (1992) Decontaminating soil with enzymes: an in situ method using phenolic and anilinic compounds. Environ Sci Technol 26:1876–1881.

Braudeau E, Mohtar RH (2004) Water potential in non rigid unsaturated soil-water medium. Water Resour Res 40:W05108.

Braudeau E, Mohtar RH (2009) Modeling the soil system: bridging the gap between pedology and soil–water physics. Glob Planet Change J (Special issue) doi:10.1016/j.gloplacha.2008.12.002.

Brewer R (1964) Fabric and mineral analysis of soils. Wiley, New York.

Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold FH (2003) Functional expression of a fungal laccase in Saccharomyces cerevisiae by directed evolution. Appl Environ Microbiol 69:987–95. Erratum in: Appl Environ Microbiol 69:5037.

Call HP, Mücke I (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase mediator systems. J Biotechnol 53:163–202.

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. J Biol Chem 274:10324–10330.

Canet R, Birnstingl JG, Malcolm DG, Lopez-Real JM, Beck AJ (2001) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Biores Technol 76:113–117.

Cohen R, Persky L, Hadar Y (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of genus Pleurotus. Appl Microbiol Biotechnol 58:582–594.

Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a] pyrene by laccases from Trametes versicolor. Appl Environ Microbiol 62:4563–4567.

Colpaert JV, van Assche JA (1987) Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. Funct Ecol 1:415–421.

Colpaert JV, van Assche JA (1992) The effects of cadmium and the cadmium–zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. Plant Soil 145:237–243.

Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. J Biotechnol 93:143–158.

Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus Paxillus involutus. Appl Environ Microbiol 70:7413–7417.

Couto SR, Gundin M, Lorenzo M, Sanroman MA (2002) Screening of supports and inducers for laccase production by Trametes versicolor in semi-solid state conditions. Process Biochem 38:249–255.

Couto SR, Herrera JLT (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv 24:500–513.

D'Annibale A, Rosetto F, Leonardi V, Federici F, Petruccioli M (2006) Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol 72:28–36.

Diano N, Grano V, Fraconte L, Caputo P, Ricupito A, Attanasio A, Bianco M, Bencivenga U, Rossi S, Manco I, Mita L, Del Pozzo G, Mita DG (2007) Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. Appl Catal B Environ 69:252–261.

Donnelly KC, Chen JC, Huebner HJ, Brown KW, Autenrieth RL, Bonner JS (1997) Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. Environ Toxicol Chem 16:1105–1110.

Dubroca J, Brault A, Kollmann A, Touton I, Jolivalt C, Kerhoas L, Mougin C (2005) Biotransformation of nonylphenol surfactants in soils amended with contaminated sewage sludges. In: Lichtfouse E, Dudd S, Robert D (eds) Environmental Chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems. Springer, Berlin, pp 305–315.

Duran N, Esposito E (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Appl Catal B Environ 28:83–99.

Dutta T, Sahoo R, Sengupta R, Ray SS, Bhattacharjee A, Ghosh S (2008) Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi

Penicillium citrinum: production and characterization. J Ind Microbiol Biotechnol 35:275–282.

Enguita FJ, Marcal D, Martins LO, Grenha R, Henriques AO, Lindley PF, Carrondo MA (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis. J Biol Chem 279:23472–23476.

Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component – a laccase with enhanced thermostability properties. J Biol Chem 278:19416–19425.

EPA (2008) http://epa.gov/OUST/cat/biopiles.htm. Cited 20 April 2008

Esteve-Nunez A, Caballero A, Ramos JL (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Microbiol Mol Biol Rev 65:335–352.

Fernando T, Bumpus JA, Aust SD (1990) Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol 56:1666–1671.

Funk SB, Crawford DL, Crawford RL, Mead G, Davis-Hooker W (1995) Full-scale anaerobic bioremediation of trinitrotoluene contaminated soil. Appl Biochem Biotech 51:625–633.

Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Lacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M (2004) The structure of Rigidoporus lignosus laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. J Mol Biol 342:1519–1531.

Gianfreda L, Rao MA (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enz Microb Technol 35:339–354.

Gianfreda L, Rao MA, Violante A (1991) Invertase (□-fructosidase): effects of montmorillonite, Al-hydroxide and Al(OH)x-montmorillonite complex on activity and kinetic properties. Soil Biol Biochem 23:581-587.

Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J (2002) Crystal structure of a laccase from Melanocarpus albomyces with an intact trinuclear copper site. Nat Struct Biol 9:601–605.

Han MJ, Choi HT, Song HGJ (2004) Degradation of phenanthrene by Trametes versicolor and its laccase. Microbiology 42:94–8

Haynes CA, Norde W (1994) Globular proteins at solid/liquid interfaces. Colloid Surface B 2:517–566.

Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martínez AT (1998) A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from Pleurotus eryngii and Bjerkandera adusta. FEBS Lett 428:141–146.

Hodgson J, Rho D, Guiot SR, Ampleman G, Thiboutot S, Hawari J (2000) Tween 80 enhanced TNT mineralization by Phanerochaetechry sosporium. Can J Microbiol 46:110–118.

Hu MR, Chao YP, Zhang GQ, Yang XQ, Xue ZQ, Qian SJ (2007) Molecular evolution of Fome lignosus laccase by ethyl methane sulfonate-based random mutagenesis in vitro. Biomol Eng 24:619–24.

Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW (2004) Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. J Environ Eng Sci 3:1–19.

Jackson MM, Hou LH, Banerjee HN, Sridhar R, Dutta SK (1999) Disappearance of 2,4-dinitrotoluene and 2-amino,4,6-dinitrotoluene by Phanerochaete chrysosporium under non-ligninolytic conditions. Bull Environ Contam Toxicol 62:390–396.

Jensen KA Jr, Bao W, Kawai S, Srebotnik E, Hammel KE (1996) Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by Ceriporiopsis subvermispora in the absence of lignin peroxidase. Appl Environ Microbiol 62:3679–3686.

Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A (1996) Degradation of anthracene by laccase of Trametes versicolor in the presence of different mediator compounds. Appl Microbiol Biotechnol 46:313–317.

Johannes C, Majcherczyk A (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl Environ Microbiol 66:524–528.

Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ Pollut 133:71–84.

Johnsen AR, Karlson U (2007) Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. Appl Microbiol Biotechnol 76:533–543.

Jolivalt C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, Mougin C (2005) Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus Trametes versicolor in the yeast Yarrowia lipolytica for environmental applications. Appl Microbiol Biotechnol 66:450–456.

Jolivalt C, Brenon S, Caminade E, Mougin C, Pontie M (2000) Immobilization of laccase from Trametes versicolor on a modified PVDF microfiltration membrane: characterisation of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in waste water. J Membr Sci 180:103–113.

Kahraman SS, Gurdal IH (2002) Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. Biores Technol 82:315–317.

Kiiskinen L, Saloheimo M (2004) Molecular cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of a laccase gene from the Ascomycete Melanocarpus albomyces. Appl Environ Microbiol 70:137–144.

Klonowska A, Gaudin C, Asso M, Fournel A, Réglier M, Tron T (2005) LAC3, a new low redox potential laccase from Trametes sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. Enz Microb Technol 36:34–41.

Knutson K, Kirzan S, Ragauskas A (2005) Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase. Biotechnol Lett 27:753–758.

Kollmann A, Boyer FD, Ducrot PH, Kerhoas L, Jolivalt C, Touton I, Einhorn J, Mougin C (2005) Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in Trametes versicolor ATCC 32745. Appl Microbiol Biotechnol 68:251–258.

Kulkarni K, Chaudhari A (2007) Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. J Environ Manage 85:496–512.

Lenin L, Forchiassin F, Ramos AM (2002) Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus Trametes trogii. Mycologia 94:377–383.

Leontievsky A, Myasoedova N, Pozdnyakova N, Golovleva L (1997) “Yellow” laccase of Panus tigrinus oxidizes nonphenolic substrates without electron-transfer mediators. FEBS Lett 413:446–448.

Lui E, Zhao AH, Obbard JP (2005) Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. Enz Microb Technol 37:487–496.

Mc Laren AD, Peterson GH, Barshad I (1958) The adsorption of enzymes and proteins on clay minerals. IV. Kaolinite and montmorllonite. Soil Sci Soc Am Proc 22:239–244.

Mc Laren AD (1954) The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite. J Phys Chem 58:129–137.

Madzak C, Mimmi MC, Caminade E, Brault A, Baumberger S, Briozzo P, Mougin C, Jolivalt C (2006) Shifting the optimal pH of activity of a laccase from the fungus Trametes versicolor by structure-based mutagenesis. Protein Eng Des Sel 19:77–84.

Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast Yarrowia lipolytica: a review. J Biotechnol 109:63–81.

Martínez AT (2002) Molecular biology and structure-function of lignin degrading heme peroxidases. Enz Microb Technol 30:425–444.

Mayer A, Staples RC (2002) Laccase: new function for an old enzyme. Phytochemistry 60:551–565.

Messerschmidt A (1997) Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore.

Minussi RC, Pastore GM, Duran N (2007) Laccase induction in fungi and laccase/N–OH mediator systems applied in paper mill effluent. Biores Technol 98:158–164.

Mollea C, Bosco F, Ruggieri B (2005) Fungal biodegradation of naphtalene: microcosms studies. Chemosphere 60:633–643.

Mougin C, Kollmann A, Jolivalt C (2002) Enhanced production of laccase in the fungus Trametes versicolor by the addition of xenobiotics. Biotechnol Lett 24:139–142.

Mougin C (2002) Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. Polycycl Aromat Comp 22:1–33.

Mougin C, Jolivalt C, Malosse C, Sigoillot JC, Asther M, Chaplain V (2002) Interference of soil contaminants with laccase activity during the transformation of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media. Polycycl Aromat Comp 22:673–688.

Mougin C, Jolivalt C, Briozzo P, Madzak C (2003) Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. Env Chem Lett 1:145–148.

Mueller JG, Cerniglia CE, Pritchard PH (1996) Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Crawford RL, Crawford DL (eds) Bioremediation: principles and applications. Cambridge University Press, London, pp 125–194.

Nicell JA, Wright H (1997) A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. Enzyme Microb Technol 21:302–310.

Nishino SF, Paoli JC, Spain JC (2000) Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2–6 dinitrotoluene. Appl Environ Microbiol 66:2139–2147.

Norde W (1986) Adsoprtion of proteins from solution at the solid–liquid interface. Adv Colloid Interface Sci 25:267–340.

Novotny C, Erbanova P, Sasek V, Kubatova A, Cajthaml T, Lang E, Krahl J, Zadrazil F (1999) Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white-rot fungi. Biodegradation 10:159–168.

Nyanhongo GS, Rodríguez-Couto S, Guebitz GM (2006) Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from Trametes modesta. Chemosphere 64:359–370

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus. Appl Environ Microbiol 66:920–924.

Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by Coriolopsis gallica UAMH 8260 laccase. Appl Environ Microbiol 65:3805–3809.

Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. J Biol Chem 277:37663–37669.

Pogni R, Baratto MC, Giansanti S, Teutloff C, Verdin J, Valderrama B, Lendzian F, Lubitz W, Vazquez-Duhalt R, Basosi R (2005) Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from Bjerkandera adusta. Biochemistry 44:4267–4274.

Pointing SB (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 57:20–33.

Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP (2000) Optimization of laccase production by Pycnoporus sanguineus in submerged liquid culture. Mycologia 92:139–144.

Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya OV (2004) Catalytic properties of yellow laccase from Pleurotus ostreatus D1. J Mol Catal B Enzym 30:19–24.

Quiquampoix H (1987) A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a b-D-glucosidase on different mineral surfaces. Biochimie 69:753–763.

Quiquampoix H (2000) Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme acitivity in soil. In: Bollag JM, Stotzky G (eds) Soil biochemistry, vol 10. Marcel Dekker, New York, pp 171–206.

Quiquampoix H, Abadie J, Baron MH, Leprince F, Matumoto-Pintro PT, Ratcliffe RG, Staunton S (1995) Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. In: Horbett TA, Brash JL (eds) Proteins at interfaces II. ACS Symposium Series 602, American Chemical Society, Washington, DC, A995, pp 321–333.

Rama R, Sigoillot JC, Chaplain V, Asther M, Jolivalt C, Mougin C (2001) Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. Polycycl Aromat Comp 18:397–414.

Ramirez-Martinez JR, Mc Laren AD (1966) Some factors influencing the determination of phosphatase activity in native soils and in soils sterilized by irradiation. Enzymologia 31:23–38.

Ramos JL, Gonzalez-Perez MM, Caballero A, van Dillewijn P (2005) Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. Curr Opin Biotechnol 16:275–281.

Reid BJ, Jones KC, Semple KT (2000) Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environ Pollut 108:103–112.

Riva S (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol 24:219–226.

Rodríguez-Couto S, Toca-Herrera JL (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Biotechnol Adv 25:558–569.

Romantschuk M, Sarand I, Petanen T, Peltola R, Jonsson-Vihanne M, Koivula T (2000) Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environ Pollut 107:179–185.

Ruggaber TP, Talley JW (2006) Enhancing bioremediation with enzymatic processes: a review.

Prac Period Hazard Toxic Radioact Waste Manage 10:73–85.

Ryan BJ, Carolan N, Faga CO (2006) Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? Trends Biotechnol 24:359–363.

Ryan D, Leukes W, Burton S (2007) Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by Trametes versicolor. Biores Technol 98:579–587.

Sandwick RK, Schray KJ (1988) Conformational states of enzymes bound to surfaces. J Colloid Interface Sci 121:1–12.

Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Fournel A, Sigoillot JC, Asther M (2003) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. Appl Microbiol Biotechnol 64:346–352.

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic, London.

Saito T, Kato K, Yokogawa Y, Nishida M, Yamashida N (2004) Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. J Biosci Bioeng 98:64–66.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol 20:243–248.

Sax IR, Lewis RJ (1999) Nitro-compounds of aromatic hydrocarbons. In: Lewis RJ (ed) Dangerous properties of industrial material, 7th edn., vol. II. Wiley, New York, pp 2534–2536.

Simpson JR, Evans WC (1953) The metabolism of nitrophenols by certain bacteria. Biochem J 55:XXIV.

Staunton S, Quiquampois H (1994) Adsorption and conformation of bovine serum albumine on montmorillonite: modification of the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protei methylation and pH variation. J Col Int Sci 166:89–94.

Tanaka T, Tomasaki T, Nose M, Tomidokoro N, Kadomura N, Fujii T, Taniguchi M (2001) Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from Trametes sp. in a rotating reactor. J Biosci Bioeng 92:312–316.

Tavares APM, Coelho MAZ, Coutinho JAP, Xavier AMRB (2005) Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. J Chem Technol Biotechnol 80:669–676.

Torres E, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl Catal B Environ 46:1–15.

Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida N (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. Chemosphere 42:271–276.

UNEP (2001) Stockholm convention on persistent organic pollutants. Stockholm, Sweden.

USFDA (2003) Agency Response letter GRAS Notice No. GRN 000122, http://www.cfsan.fda. gov, Cited 20 April 2008.

Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttila M, Saloheinmo M (2003) Improvement of foreign-protein production in Aspergillus niger var awamori by constitutive induction of the unfolded-protein response. Appl Environ Microbiol 69:6979–6986.

Van Acken B, Godefroid LM, Peres CM, Naveau H, Agathos SN (1999) Mineralization of 14C-Uring labelled 4-hydroxylamino- 2,6-dinitrotoluene by manganese-dependant peroxidase of the white-rot fungus Phlebia radiata. J Biotechnol 68:159–169.

Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. Phytochemistry 65:249–259.

Wanger M, Nicell JA (2002) Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. Water Res 36:4041–4052.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol Adv 22:161–187

Whiteley CG, Lee DJ (2006) Enzyme technology and biological remediation. Enzyme Microb Tech 38:291–316.

Wu Y, Teng Y, Li Z, Liao X, Luo Y (2008) Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil in Yucheng. Soil Biol Biochem 40:789–796.

Ye J, Singh A, Ward OP (2004) Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen containing xenobiotics. World J Microbiol Biotechnol 20:117–135.

Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S, Morohoshi N (1993) N-linked carbohydrate chains protect lacase III from proteolysis in Coriolus versicolor. J Gen Microbiol 139:179–185.

Xu F, Shin W, Brown SH, Wahleithner JA, Sundaram UM, Solomon EI (1996) A study of a series of recombinant fungal laccase and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox

potential, substrate specificity and stability. Biochim Biophys Acta 1292:303–311.

Xu F (1999) Laccases. In: Flickinger MC, Brew SW (eds) Encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. Wiley, New York, pp 1545–1554.

Zumarraga M, Plou MJ, García-Arellano H, Ballesteros A, Alcalde M (2007) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases engineered by directed evolution. Biocat Biotransform 25:219–228.

فصل هشتم

متابولیسم بی‌هوازی و پالایش زیستی خاک‌های آلوده به مواد انفجاری

Raj Boopathy

۸-۱- مقدمه

بیشتر مواد زیست‌بیگانه که از راه کشاورزی و صنعت وارد محیط می‌شوند، مواد آروماتیک دارای گروه نیترو هستند. گروه‌های نیترو در حلقه‌های آروماتیک عامل دوام و سمیت این ترکیب‌ها بوده و به همین دلیل به آن‌ها افزوده می‌شوند. ترکیب‌های نیتروآروماتیک از چندین مسیر مانند استفاده از آفت‌کش‌ها، پلاستیک‌ها، مواد دارویی، دفن زباله‌های صنعتی و استفاده از مواد منفجره وارد خاک، آب و غذا می‌شوند. ترکیب نیتروآروماتیک تری‌نیتروتولوئن[1] (TNT) بیشتر از راه فعالیت‌های نظامی مانند ساخت، بارگیری و دفن مواد منفجره و آلاینده وارد زیست‌بوم‌های خاک و آب می‌شود. ممکن است که مشکل آلایندگی این ترکیب‌ها در آینده به دلیل دفن و پاک‌سازی نظامی جنگ‌افزارهای ناخواسته، افزایش پیدا کند.

دگرگونی زیستی TNT و دیگر نیتروآروماتیک‌ها توسط باکتری‌های هوازی در آزمایشگاه بارها گزارش شده است (بوپاتی و همکاران، ۲۰۰۴a ،b؛ دیکل و ناکموس، ۱۹۹۱؛ دوکوئه و همکاران، ۱۹۹۳؛ فانک و همکاران، ۱۹۹۳؛ مک کورمیک و همکاران، ۱۹۷۶، ۱۹۸۱؛ نیشینو و اسپاین، ۱۹۹۳؛ اسپاین و گیبسون، ۱۹۹۱، زیر و کیرنی، ۱۹۸۴). گزارش شده که تجزیه زیستی ۲ و ۴ دی‌نیتروتولوئن از راه ۴-متیل-۵-نیتروکتکول با آنزیم دی‌اکسیژناز و توسط *سودوموناس* انجام می‌شود (اسپانگورد و همکاران، ۱۹۹۱). دوکوئه و همکاران (۱۹۹۳) به طور موفقیت‌آمیزی سویه هیبرید *سودوموناس* را طراحی کردند که TNT را معدنی کرد. دیده شده که قارچ‌های پوسیدگی سفید، TNT نشان‌دار را معدنی می‌کنند (فرناندو و همکاران، ۱۹۹۰). پژوهش اسپایکر و همکاران (۱۹۹۲) نشان داد که *فانروکت کرایزوسپوریوم* کاندیدای خوبی برای زیست‌پالایی جایگاه‌های آلوده به TNT که دارای غلظت بالای مواد منفجره بودند، نیست و دلیل آن حساسیت بالای این قارچ به آلاینده‌ها است. مایکل و گاتشاک (۱۹۹۴) نشان دادند که فعالیت لیگنین پراکسیداز این قارچ توسط ماده واسطه TNT یعنی هیدروکسیل‌آمینودی‌نیتروتولوئن ممانعت می‌شود. ولی و همکاران (۱۹۹۲) دریافتند که ۲ و ۴ دی‌نیتروتولوئن به طور کامل توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید تجزیه شد.

براساس مشاهدات اکولوژیک، باکتری‌های متانوژن و کاهنده‌ی سولفات ممکن است ترکیب‌های نیتروآروماتیک را در شرایط بی‌هوازی متابولیزه کنند. البته این اتفاق زمانی رُخ می‌دهد که گیرنده و پذیرنده مناسب الکترون در محیط وجود داشته باشد. اما این توانایی تا به امروز اثبات نشده است. در شرایط بی‌هوازی، باکتری کاهنده‌ی سولفات *دسولفوویبریو* (سویه B)، TNT را به تولوئن تغییر

1. Trinitrotoluene

کـاهش می‌دهد (بوپاتی و کولپا، ۱۹۹۲؛ بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۳a). گورونتزی و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردنـد که در شـــرایط بی‌هوازی، باکتری‌های متانوژن نیتروفنل و نیتروبنزوئیک اســـید را کاهش می‌دهند. پریوس و همکاران (۱۹۹۳) تبدیل TNT به تری‌آمینوتولوئن توسط *دسولفوویبریو* را گزارش کرده‌اند.

۸-۲- دگرگونی زیستیِ بی‌هوازی ترکیب‌های نیتروآروماتیک

متابولیسـم بی‌هوازی نیتروآروماتیک‌ها توسـط باکتری‌ها به اندازه‌ی مسـیرهای هوازی مطالعه نشده اسـت. دلیل این مطالعه کمتر هم شـاید دشـواری کار با کشـت‌های بی‌هوازی یا کند بودن رشـد بی‌هوازی‌ها باشـد. پژوهش‌های اولیه روی متابولیسـم بی‌هوازی ترکیب‌های نیتروآروماتیک توسـط مـک‌کورمیـک و همکـاران (۱۹۷۶) آغـازی بر این گونـه پژوهش‌هـا بود و مفید بودن میکروب‌های بی‌هوازی را نشان داد. اثبات موفق تجزیه هگزاهیدرو-۱، ۲، ۳-تری‌نیترو- ۱، ۳، ۵-تریازین (RDX) توســط لجن فاضــلاب (مک‌کورمیک و همکاران، ۱۹۸۱؛ کارپنتر و همکاران، ۱۹۷۸) در شـــرایط بی‌هوازی، اهمیت بی‌هوازی‌ها در تیمار مواد زائد را بیشـتر نشـان داد. RDX به صـورت پی در پی توســط بی‌هوازی‌هـا بـه مشـــتقـات نیتروزو کاهش یافته و در ادامه به فرمالدهید و متانول تبدیل می‌شـود. هالاس و الکسـاندر (۱۹۸۳) دگرگونی موفق نیتروبنزن، نیتروبنزوئیک اسید، نیتروتولوئن و نیتروآنیلین توسط لجن فاضلاب در شرایط بی‌هوازی را نشان دادند.

متانوژن‌ها بی‌هوازی‌های اجباری هسـتند که در محیطی با پتانسـیل اکسـایش-کاهش کمتر از ۳۰۰ mV- رشـد می‌کنند. آن‌ها سـوبسـتراهای گوناگون را به فرآورده‌ی یک کربنی مانند متان و HCOOH تبدیل می‌کنند. نقش برخی ترکیب‌های جدید و سـاز و کار جریان مواد تک کربنی در این باکتری‌ها و همین‌طور آرایش زنجیره انتقال الکترون در آن‌ها به طور رسـمی روشن نشده است. به دلیل توانایی محدود این باکتری‌ها در اسـتفاده از سـوبسـتراها، تبدیل مولکول‌های پیچیده‌تر به متان به فعالیت باکتری‌های غیرمتانوژن همراه با آن‌ها بسـتگی دارد. گزارشـی از تجزیه ترکیب‌های آروماتیک توسـط متانوژن‌ها در محیط کشـت خالص در دسـت نیسـت. پژوهش‌های گورونتزی و همکـاران (۱۹۹۳) دربـاره‌ی دگرگونی میکروبی ترکیـب‌هـای نیتروآرومـاتیک توســط باکتری‌های متـانوژن نشـــان داد کـه متـانوژن‌ها می‌توانند ترکیب‌های نیتروآروماتیک را به ترکیب‌های آمینوی متنـاظر با آن دگرگون کنند. بوپاتی و کولپا (۱۹۹۴) باکتری متانوژن *متانوکوکوس*[1] که TNT را به ۲، ۴-دی‌آمینو نیتروتولوئن تبـدیـل می‌کرد، از رســـوبات دریاچه جدا کردند. همچنین این باکتری نیتروفنول و نیتروبنزن را هم دگرگون می‌کرد. مواد واســطه مشـــاهده شـــده مشـــتقات آمینوی

1. *Methanococcus* sp.

ترکیب‌های اصلی بودند. طبق برخی گزارش‌ها دگرگونی کاهشی ترکیب‌های نیتروآروماتیک سبب سمیت‌زدایی ماده می‌شود (بوید و همکاران، ۱۹۸۳؛ باترسبی و ویلسون، ۱۹۸۹).

آنزیم‌های ویژه‌ی مسئول در فرایندهای کاهشی متانوژن‌ها هنوز شناسایی نشده‌اند. آنگرمیر و سیمون (۱۹۸۳) پیشنهاد کردند که کاهش ترکیب‌های آروماتیک احتمالاً با هیدروژناز و فرودوکسین[1] کاتالیز می‌شوند. مشاهده‌ی کاهندگان سولفات و باکتری‌های متانوژن توسط تعداد زیادی از پژوهش‌گران (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۳a؛ بوپاتی و کولپا، ۱۹۹۴، بوپاتی، ۱۹۹۴، گورونتزی و همکاران، ۱۹۹۳؛ پریوس و همکاران، ۱۹۹۳) پیشنهاد می‌کند که با به کارگیری دهنده‌گان و پذیرندگان الکترونی مناسب، می‌توان از این جانداران در زیست‌پالایی در شرایط بی‌هوازی استفاده کرد.

بوپاتی و همکاران (۱۹۹۳b) نشان دادند که TNT می‌تواند در شرایط بی‌هوازی و با استفاده از پذیرندگان مختلف الکترون تغییر شکل یابد. نمونه خاک جمع‌آوری شده از کارخانه مهمات‌سازی جولیت در ایلی‌نویز ایالات متحده[2] در حضور باکتری‌های کاهنده نیترات، کاهنده سولفات و متانوژن انکوباسیون شد. نتایج نشان دادکه TNT در حضور هر سه باکتری تغییرشکل یافته ولی زمانی‌که پذیرنده الکترونی در دسترس نبود، تغییر شکلی هم رخ نداد. ۴-آمینو-۲، ۶-دی‌نیتروتولوئن و ۲-آمینو-۴، ۶ دی‌نیتروتولوئن واسطه‌هایی بودند که در این پژوهش دیده شدند. این پژوهش نشان داد که اگر پذیرنده‌ی مناسب الکترون در سیستم باشد، باکتری‌های بی‌هوازی TNT را به ترکیب‌های آمینو کاهش می‌دهند.

۸-۳- باکتری‌های کاهنده سولفات

اگرچه اکسیژن پرکاربردترین پذیرنده الکترون در متابولیسم انرژی است، شماری از باکتری‌ها قادر به کاهش دیگر ترکیب‌ها بوده و از آن‌ها به عنوان پذیرنده‌ی الکترون استفاده می‌کنند. این فرایند تنفس بی‌هوازی بازدهی انرژی کمتری دارد اما به این باکتری‌ها امکان زیستن در محیط‌هایی که اکسیژن نیست را می‌دهد. باکتری‌های کاهنده سولفات بی‌هوازی‌های اجباری هستند که معمولاً باهم دیده می‌شوند. چراکه توان خود را برای کاهش غیرجذبی سولفات (فرایندی همانند تنفس هوازی که در آن یون سولفات به عنوان پذیرنده الکترون (مانند اکسیژن در تنفس هوازی) عمل می‌کند)، به اشتراک می‌گذارند. جنس کاهندگان سولفات براساس ریخت‌شناسی تعریف می‌شوند تا

1. Ferredoxin
2. Joliet Army Ammunition Plant, Joliet, IL, USA

فیزیولوژی و همه آن‌ها بجز *دسولفوتوماکولوم*[1]، گرم-منفی هستندپرکاربردترین جنس باکتریایی که برای این کار مورد استفاده قرار می‌گیرد، *دسولفوویبریو* است.

استفاده از ترکیب‌های آروماتیک غیرتخمیری در نبود اکسیژن یا نیترات ظاهراً یکی از کارهای طبیعی باکتری‌های کاهنده سولفات است. ترکیب‌های آروماتیک با بیش از دو گروه هیدروکسیل به آسانی توسط باکتری‌های تخمیری تجزیه می‌شوند (ویدل و هنسن، ۱۹۹۲). چندین گونه جدید از باکتری‌های کاهنده سولفات جداسازی شده‌اند که با ترکیب‌های آروماتیک ارتباط دارند (بک و ویدل، ۱۹۸۶؛ ویدل، ۱۹۸۸؛ اشنل و همکاران، ۱۹۸۹). بیشتر این جدایه‌های کاهنده‌ی سولفات بسیار متنوع هستند و از ترکیب‌های آلیفاتیک زیادی استفاده می‌کنند. ترکیب‌های آروماتیک اکسید شونده توسط باکتری‌های کاهنده سولفات شامل بنزووات، فنول، پی-کرزول، آنیلین و ترکیب‌های اِن-هتروسیکلیک مانند نیکوتینات، ایندول و کینولین هستند. همه تجزیه کنندگان شناخته شده‌ی ترکیب‌های آروماتیک از اکسیدکنندگان کامل هستند. کاهندگان سولفات از واکنش‌هایی استفاده می‌کنند که باکتری‌های دنیتریفیکاتور (شوره‌زدا)، باکتری‌های فوتوتروف و کشت هم‌زمان باکتری‌های متانوژن با استفاده از ترکیب‌های آروماتیک انجام می‌دهند (بری و همکاران، ۱۹۸۷؛ ایوانز و فوچس، ۱۹۸۷؛ هاروود و گیبسون، ۱۹۸۶؛ تیشک، ۱۹۸۹). باکتری‌های کاهنده سولفات قادر به انجام واکنش‌های زیر هستند: فعال‌سازی بنزووات به بنزوئیل کوآ (گیسلر و همکاران، ۱۹۸۸؛ هالند و همکاران، ۱۹۸۷)، کربوکسیله کردن فنول به پی-هیدروکسی بنزووات (کینول و وینتر، ۱۹۸۹؛ تیشک و فوچس، ۱۹۸۹) و حذف کاهشی گروه هیدروکسیل (تیشک و شینک، ۱۹۸۶).

۸-۳-۱- متابولیسم TNT و سایر ترکیب‌های نیتروآروماتیک توسط باکتری‌های کاهنده سولفات

بوپاتی و همکارانش (۱۹۹۳a) نشان دادند که باکتری کاهنده سولفات، *دسولفوویبریو* (سویه B) می‌تواند TNT را به تولوئن تبدیل کند. این باکتری از هضم کننده بی‌هوازی[2] تصفیه کننده فاضلاب دارای فورفورال[3] (سبوس غلات) جدا شده بود (بوپاتی و دانیلز، ۱۹۹۱) که افزون بر کاربرد سولفات به عنوان پذیرنده الکترون، از نیترات هم برای این منظور استفاده می‌نماید. این باکتری همچنین از نیترات به عنوان منبع نیتروژن استفاده به عمل می‌آورد. آزمایش‌های بیشتر نشان داد که این

1. *Desulfotomaculum*
2. Anaerobic digester
3. Furfural

باکتری می‌تواند از گروه نیتروی TNT هم به عنوان پذیرنده الکترون و هم منبع نیتروژن استفاده کند.

برخی از باکتری‌های کاهنده سولفات از نیترات هم افزون بر سولفات به عنوان پذیرنده‌ی پایانی الکترون استفاده می‌کنند (کیت و هربرت، ۱۹۸۳). این واکنش با انتقال الکترون فسفوریلاسیون کوپل شده (لگال و فائوکو، ۱۹۸۸؛ استینکام و پک، ۱۹۸۱) و توسط نیتریت ریداکتاز تنفسی که جرم مولکولی ۶۵ کیلودالتون داشته و دارای شش هسته هِم نوع c[1] است، کاتالیز می‌شود. این نیتریت ریداکتاز که به سیتوکروم C3 هگزا هم معروف است در بی‌هوازی‌های اختیاری و اجباری وجود دارد (لیو و پک، ۱۹۸۱؛ ۱۹۸۸) و با نیتریت ریداکتاز تنظیم کننده (دارای سایروهم[2] آهنی غیرهم است) که در بیشتر گیاهان و باکتری‌ها یافت می‌شود و نقش‌اش جذب نیتروژن[3] است، ارتباطی ندارد (وگا و کامین، ۱۹۷۷). نیتریت ریداکتاز ارتباط نزدیک با هیدروژناز دارد و احتمالاً پروتئین انتقالی غشایی است (استینکمپ و پک، ۱۹۸۱). زیرا این پروتئین رها کننده پروتون بوده و جایگاه‌هایی برای پیوند نیتریت در بخش پری‌پلاسمیک غشای سیتوپلاسمی و جایگاهی نیز برای پیوند بنزیل ویولاجن[4] در بخش سیتوپلاسمی غشا دارد.

دسولفوویبریو (سویه B) در حضور پیرووات به عنوان سوبسترای اصلی، سولفات به عنوان پذیرنده الکترون و TNT به عنوان تنها منبع نیتروژن، توانست $100\ mg\ L^{-1}$ از TNT را در ۱۰ روز متابولیز کند (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۳a). این پژوهش‌گران نشان دادند که در شرایط متفاوت رشد، این باکتری از TNT به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌کند. این نتایج بیانگر آن است که این جدایه باکتری آنزیم‌های لازم برای استفاده از گروه نیتروی مولکول TNT به عنوان منبع نیتروژن را دارد.

به جز پیرووات، لاکتات به عنوان بهترین سوبسترا برای متابولیز کردن TNT به کار رفته و پس از آن H_2+CO_2، اتانول و فورمات قرار داشتند. مقایسه نرخ دگرگونی زیستی TNT توسط *دسولفوویبریو* با دیگر باکتری‌های کاهنده سولفات نشان داد که این جدایه جدید توان متابولیک منحصر به فرد برای تجزیه TNT دارد. این جدایه همه TNT موجود (۱۰۰ درصد) را در زمان کوتاهی (۷ روز) تجزیه کرد. سایر جدایه‌های *دسولفوویبریو* (از مجموعه ATCC)، ۵۹ تا ۷۲ درصد آن را در ۲۱ تا ۲۳ روز تجزیه کردند و *دسولفوباکتریوم ایندولیکوم*[5]، ۸۲ درصد آن را در ۳۶ روز انکوباسیون تجزیه کرد (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۳a).

---

1. C-type haem
2. Sirohaem
3. Nitrogen assimilation
4. Benzyl viologen-binding site
5. *Desulfobacterium indolicum*

آنالیز طیف‌سنجی جرمی نشان داد که بسته به شرایط محیط کشت ایزوله‌ها، مواد حدواسط گوناگونی تولید می‌شوند. وقتی آمونیوم منبع اصلی نیتروژن بود، ۲، ۴-دی‌آمینو-۶-نیتروتولوئن مهم‌ترین ماده حدواسط بود. زمانی‌که TNT تنها منبع کربن و انرژی بود، ابتدا به ۴-آمینو-۲، ۶-دی‌نیتروتولوئن و سپس به ۲، ۴-دی‌آمینو-۶-نیتروتولوئن کاهش یافت. زمانی‌که TNT تنها منبع نیتروژن بود، همه آن در طول ۱۰ روز انکوباسیون به ۲، ۴-دی‌آمینو-۶-نیتروتولوئن تبدیل شد و مقادیر بسیار کمی از ترکیب‌های ۲ و ۴-آمینو شناسایی شدند. بعداً این واسطه‌ها به تولوئن تبدیل شدند. آنالیز کمی فازهای آبی و گازی محیط کشت به روش گاز کروماتوگرافی موازنه جرمی خوبی از TNT و تولوئن را نشان داد (بوپاتی و همکاران، ۱۹۳۳a).

ترکیب‌های نیتروآروماتیک به مقاوم بودن در برابر تجزیه میکروبی شناخته می‌شوند (فیوسان، ۱۹۸۱؛ هایگلر و اسپاین، ۱۹۹۳) این موضوع تاحدی ناشی از آن است که تراکم الکترون در حلقه آروماتیک توسط گروه نیترو کم شده و از حمله الکتروفیلیک اکسیژنازها جلوگیری کرده و بنابراین مانع تجزیه هوازی ترکیب‌های نیتروآروماتیک می‌شود (بروهن و همکاران، ۱۹۸۷). در شرایط بی‌هوازی، باکتری‌های کاهنده سولفات TNT را متابولیزه می‌کنند. از بین همه متابولیت‌های تولید شده، به نظر می‌رسد تشکیل تولوئن از TNT بسیار عادی و چشم‌گیر باشد.

زمانی‌که پیرووات سوبسترای اصلی بوده و سولفات و آمونیوم هم در محیط کشت حضور داشتند، TNT توسط جدایه از مسیر ۲-آمینو و ۴-آمینو-دی‌نیتروتولوئن به دی آمینو نیتروتولوئن تبدیل شد. واکنش تبدیل یک واکنش کاهشی ساده است که توسط آنزیم نیتریت ریداکتاز انجام می‌شود. عصاره بدون یاخته فعالیت بالای نیتریت ریداکتاز را نشان داد. فعالیت نیترو ریداکتازی با سنجش نوری در ۳۲۵ نانومتر و با مصرف دی‌آمینو نیتروتولوئن پایش شد. بیشتر گونه‌های *دسولفوویبریو* دارای آنزیم‌های نیتریت ریداکتاز هستند که نیترات را به آمونیوم کاهش می‌دهند (ویدل، ۱۹۸۸). این سویه گروه نیتروی TNT را به گروه آمینو کاهش داد. زمانی که TNT تنها منبع نیتروژن بود، از آن تولوئن ایجاد شد. مک‌کورمیک و همکاران (۱۹۷۶) نشان دادند که در حضور آنزیم *ویلونلا آلکالسنز*[1]، TNT توسط H_2 به تری‌آمینوتولوئن کاهش یافت (سه مول H_2 برای کاهش هر گروه نیترو به گروه آمینو مورد نیاز است). پروس و هکاران (۱۹۹۳) ملاحظه کردند که تشکیل تری‌آمینوتولوئن از TNT توسط باکتری کاهنده سولفات جدا شده از لجن فاضلاب انجام می‌شود.

بوپاتی و همکاران (۱۹۳۳a) نشان دادند که تولوئن از تری‌آمینوتولوئن تشکیل می‌شود. در این فرایند، ایزوله باکتری از آمونیوم رها شده از مولکول TNT اصلی به عنوان منبع نیتروژن برای رشد

1. *Veillonella alkalescens*

استفاده می‌کند. این کار با کاهش گروه نیترو و سپس دی‌آمینه شدن کاهشی انجام می‌شود. در فرایند متابولیسم TNT غلظت چشم‌گیری از تولوئن در محیط کشت دیده شد (بوپاتی و همکاران، ۱۹۳۳a) و ظاهراً یون نیتریت در آن دیده نشد. پس از ۶ ماه انکوباسیون، ساختار حلقه آروماتیک شکسته نشد و متابولیتی غیر از تولوئن دیده نشد. دی‌آمینه شدن کاهشی با آنزیم دی‌آمیناز در *سودوموناس* انجام می‌شود (نائومُوآ و همکاران، ۱۹۸۶). واکنش دی‌آمینه شدن کاهشی ابتدا در تجزیه ۲-دی‌آمینوبنزووات توسط متانوژن‌ها اثبات شد (تیشک و شنیک، ۱۹۸۸). هیدروکسیله شدن کاهشی جنتیسات به بنزووات و استات در باکتری تخمیری HQGO1 دیده شد (زوویک و شنیک، ۱۹۸۹).

بلر و همکاران (۱۹۹۲) و ادوارد و همکاران (۱۹۹۲) معدنی شدن کامل تولوئن در شرایط احیایی سولفات را نشان دادند. این تجزیه کنندگان تولوئن کاهنده‌ی سولفات را می‌توان در ترکیب با *دسولفوویبریو* (که توسط بوپاتی و همکاران (۱۹۹۳a) توصیف شد) به کار برد تا TNT را به طور کامل به CO_2 تجزیه کنند.

همچنین *دسولفوویبریو* (سویه B) نیتروآروماتیک‌های دیگر مانند ۲، ۴-دی‌نیتروفنول (2,4-DNP)، ۲، ۴-دی‌نیتروتولوئن (2,4-DNT)، ۲، ۶-دی‌نیتروتولوئن (2,6-DNT) و آنیلین را نیز متابولیزه می‌کند (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۳a). همان‌گونه که توسط بوپاتی و کولپا (۱۹۹۳) نشان داده شده است، *دسولفوویبریو* از همه نیتروآروماتیک‌های بررسی شده به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌نماید. همین‌طور این باکتری از 2,4-DNT، 2,6-DNT و 2,4-DNP به عنوان پذیرنده الکترون در نبود سولفات استفاده می‌کند. آنالیز GC/MS نمونه‌های محیط کشت نشان داد که فنول در 2,4-DNP و بنزن در آنیلین به عنوان مواد واسطه هستند. گورونتزی و همکاران (۱۹۹۳) دگرگونی نیتروفنول‌ها و نیتروبنزوئیک اسیدها توسط کاهندگان سولفات مانند *دسولفوویبریو دسولفوریکنس*[1]، *دی. گیگاس*[2]، *دسولفوکوکوس مولتی‌وُرانس*[3] و *دسولفوتوماکولوم اُرینتیس*[4] را نشان دادند. همه نیتروآروماتیک‌ها به ترکیب‌های آمینوی نظیر تبدیل شدند.

شنل و همکاران (۱۹۸۹) باکتری کاهنده سولفات جدیدی به نام *دسولفوباکتر آنیلینی*[5] را جدا کردند که آنیلین را به طور کامل به دی‌اکسید کربن و آمونیوم تبدیل و سولفات را به سولفید کاهش می‌داد. این اولین باکتری بی‌هوازی اجباری مشاهده شده بود که در محیط کشت خالص دارای آنیلین به عنوان منبع کربن و دهنده الکترون رشد می‌کرد. دو مسیر متابولیک برای تجزیه

1. *desulfuricans*
2. *gigas*
3. *Desulfococcus multivorans*
4. *orientis*
5. *Desulfobacter anilini*

آنیلین توسط این باکتری پیشنهاد شد. الف) آنیلین به ۲-آمینو بنزووات یا ۴-آمینو بنزووات کربوکسیله شده و سپس آمینو بنزووات به صورت کاهشی به بنزووات دی‌آمینه شده و در ادامه متابولیزه می‌شود (زیگلر و همکاران، ۱۹۸۷). ب) آنیلین از راه هیدرولیز به فنول دی‌آمینه شده و در ادامه با کربوکسیله شدن به ۴-هیدروکسی بنزووات یا تغییر کاهشی به سیکلو هگزانول یا سیکلو هگزانون تجزیه می‌شود. به نظر هردو مسیر امکان‌پذیر هستند چرا که باکتری مورد نظر از هردوی این واسطه‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کرد.

اشنل و شینک (۱۹۹۱) گزارش کردند که *دسولفوباکتریوم آنیلینی*، آنیلین را از مسیر دی‌آمینه شدن کاهشی ۴-آمینو بنزویل کوآ تجزیه می‌کنند. در گام اول، کربوکسیله شدن آنیلین به ۴-آمینو بنزووات انجام شد، در ادامه فعال‌سازی ۴-آمینو بنزووات به ۴-آمینو بنزوییل کوآ انجام شد که سپس به صورت کاهشی به بنزوییل کوآ، دی‌آمینه شد. این فرآورده به مسیر نرمال بنزووات رفته و منجر به سه مولکول استیل کوآ شد. حضور کربن مونواکسید دهیدروژناز و فورمات دهیدروژناز در *دسولفوباکتریوم آنیلینی* نشان می‌دهد که بقایای استیل از مسیر کربن مونو اکسید دهیدروژناز اکسید شده است (اشنل و همکاران، ۱۹۸۹).

اشنل و شینک (۱۹۹۲) باکتری کاهنده سولفاتی جدا کردند که همراه با کاهش سولفات به سولفید و رهاسازی آمونیوم، ۳-آمینو بنزووات را به دی‌اکسید کربن اکسید می‌کرد. فعالیت بالای کربن مونواکسید دهیدروژناز بیانگر این بود که استیل کوآ از مسیر کربن مونو اکسید دهیدروژناز اکسید شده است باوجود این‌که فعالیت ۲-اُکسوگلوتارات سینتاز هم در آن دیده شد. زمانی‌که پیرووات به عنوان سوبسترا بود هم فعالیت مشابهی دیده شد. شاید حضور هردو آنزیم سینتاز به نیاز آن‌ها در متابولیسم جذبی[1] ربط دارد. کربن مونواکسید دهیدروژناز و پیرووات سینتاز احتمالاً آنزیم‌های کلیدی در رشد اتوتروفی با هیدروژن و سولفات هم هستند. طبق واکنش زیر اکسیداسیون کامل هر مول ۳-آمینو بنزووات طبق معادله زیر منجر به تولید kJ ۱۸۶- انرژی می‌شود:

$$2C_7H_6NO_2^- + 7SO_4^{2-} + 11H^+ = 14CO_2 + 2NH_4^+ + 7HS^- + 4H_2O \qquad \Delta G_0' = -180\ kJ$$

گام اول در تجزیه ۳-آمینو بنزووات با این باکتری کاهنده سولفات جدید، فعال‌سازی ۳-آمینو بنزوییل کوآ است (اشنل و شینک، ۱۹۹۲). کاهش بیشترِ ۳-آمینو بنزوییل کوآ به بنزوییل کوآ منجر نمی‌شود، اما به آن فرآورده کوآ-استر کاهش یافته گفته می‌شود. فعال‌سازی بنزوییل کوآ به حضور کوفاکتورها، ATP و Mg^{2+} وابسته است. واکنش‌های اسیل-کوآ سینتتاز به عنوان اولین گام در تجزیه بنزووات توسط باکتری‌های بی‌هوازی شناخته شده است.

1. Assimilatory metabolism

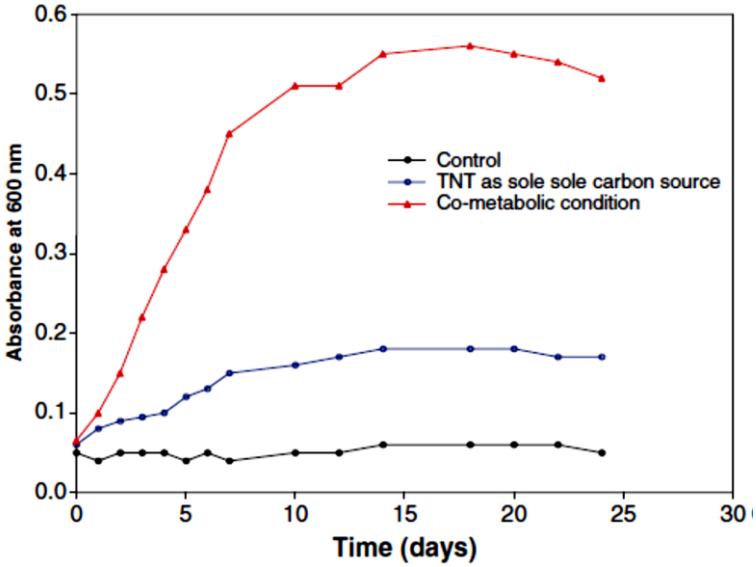
۸-۳-۲- زیست‌پالایی TNT در شرایط کاهش سولفات

خاک و آب در بیشتر تاسیسات نظامی ایالات متحده به مواد منفجره آلوده شده است که عمدتاً به دلیل ساخت، بارگیری و دفع باروت و سایر مواد منفجره است. به دلیل غیرنظامی شدن و دفن سلاح‌هایی که دیگر نیاز نیستند، مساله آلودگی به مواد منفجره در آینده ممکن است افزایش یابد. دفن مواد منفجره فرسوده به دلیل آلایندگی آن‌ها در محیط، یک مساله برای ارتش و صنایع وابسته است (وایمن و همکاران، ۱۹۷۹). TNT مهم‌ترین آلاینده در بیشتر تاسیسات مهمات‌سازی ارتش ایالات متحده است. این ماده به دلیل داشتن پیامدهای سمی روی موجودات زنده (فرناندو و همکاران، ۱۹۹۰؛ وان و همکاران، ۱۹۷۴) و جهش‌زا بودن (کاپلان و کاپلان، ۱۹۸۲)، یک خطر زیست محیطی است. دفن مقادیر زیاد TNT به روش قابل پذیرش زیست محیطی، دشواری‌های جدی دارد. روش کنونی برای پالایش آلودگی TNT ، سوزاندن خاک است که فرایندی بسیار مخرب و پرهزینه است. زیست‌پالایی می‌تواند روش مقرون به صرفه و سالمی برای تیمار آلودگی TNT باشد. حذف زیستی مواد منفجره از خاک با استفاده از رآکتورهای دوغاب خاک بی‌هوازی/آنوکسیک انجام شده است (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۸؛ بوپاتی، ۲۰۰۰، ۲۰۰۱، ۲۰۰۲). بوپاتی و مانینگ (۱۹۹۶) در آزمایشگاه خود مجموعه‌ای از باکتری‌های کاهنده سولفات شناخته شده شامل *دسولفوویبریو دسولفوریکنس* سویه A و B، *دی. گیگاس* و *دی. وولگاریس*[1] را از رسوبات نهرها جدا کردند و توان آن‌ها در تجزیه و پالایش TNT را بررسی کردند.

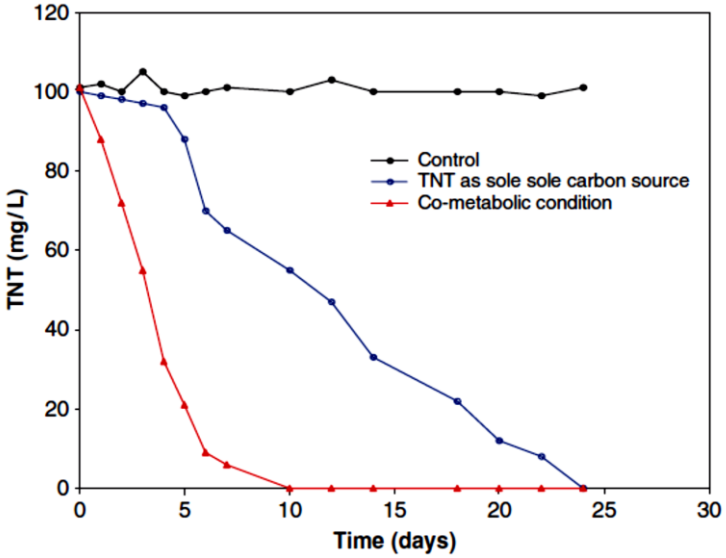
مجموع باکتری‌ها در بطری‌های سرم بی‌هوازی و در شرایط گوناگون رشد شامل TNT به عنوان تنها منبع کربن، کومتابولیت پیرووات (۳۰ mM) به عنوان سوبسترای جانبی، و کنترل غیرفعال‌سازی حرارتی طبق بوپاتی و مانینگ (۱۹۹۶)کشت داده شدند. شکل ۸-۱ نتایج کشت باکتری‌ها را نشان می‌دهد. در همه شرایط به جز در تیمار شاهد رشد دیده شد. بیشترین رشد در تیمار دارای کومتابولیت بود و همین‌طور در تیماری که TNT تنها منبع کربن بود نیز رشد دیده شد. شکل ۸-۲ حذف TNT در شرایط گوناگون را نشان می‌دهد. در همه محیط‌های کشت غلظت اولیه TNT، ۱۰۰ $mg\ L^{-1}$ بود. در تیمار شاهد، غلظت TNT در طول آزمایش ثابت ماند که نشان می‌دهد حذف فیزیکی یا شیمیایی آن رخ نداده است. حذف TNT در تیمار کومتابولیت تندتر از همه بود و همه TNT در ۱۰ روز انکوباسیون حذف شد. در محیطی که TNT تنها منبع کربن بود، حذف آن بسیار کند بود اما در ۲۵ روز در این تیمار نیز کاملاً حذف شد. نتایج نشان داد که مجموعه باکتری‌ها در حضور منبع اضافی کربن مانند پیرووات، TNT را تندتر حذف می‌کنند که می‌تواند به دلیل افزایش شمار باکتری‌ها در محیط دارای پیرووات باشد.

---

1. *vulgaris*



شکل ۸-۱ رشد *دسولفوویبریو* در شرایط گوناگون



شکل ۸-۲ غلظت TNT در شرایط رشد گوناگون

آنالیز GC-MS نمونه‌ها با و بدون پیرووات (مقایسه زمان نگه‌داشت در GC و طیف جرمی با نمونه استاندارد)، وجود واسطه‌های گوناگون را نشان داد. اولین واسطه‌هایی که دیده شدند ۴-آمینو-۲ و ۶-دی‌نیتروتولوئن (4-ADNT) و ۲-آمینو-۴ و ۶-دی‌نیتروتولوئن (2-ADNT) بود. نسبت 4-ADNT به 2-ADNT تشکیل شده از متابولیسم TNT حدوداً ۸۰ به ۲۰ بود. این واسطه‌ها در ادامه به ۲ و ۴-دی‌آمینو-۶-نیتروتولوئن (2,4-DANT) کاهش پیدا کردند. ترکیب‌های دیگری که در محیط دیده شدند به ترتیب شامل اسید نیتروبنزویک (NB)، سیکلوهگزانون، اسید ۲-متیل پنتانوییک، اسید بوتیریک و اسید استیک بودند. همه این ترکیب‌ها در هر دو محیط دارای TNT به تنهایی و TNT به همراه پیرووات دیده شدند ولی در تیمار کنترل نبودند.

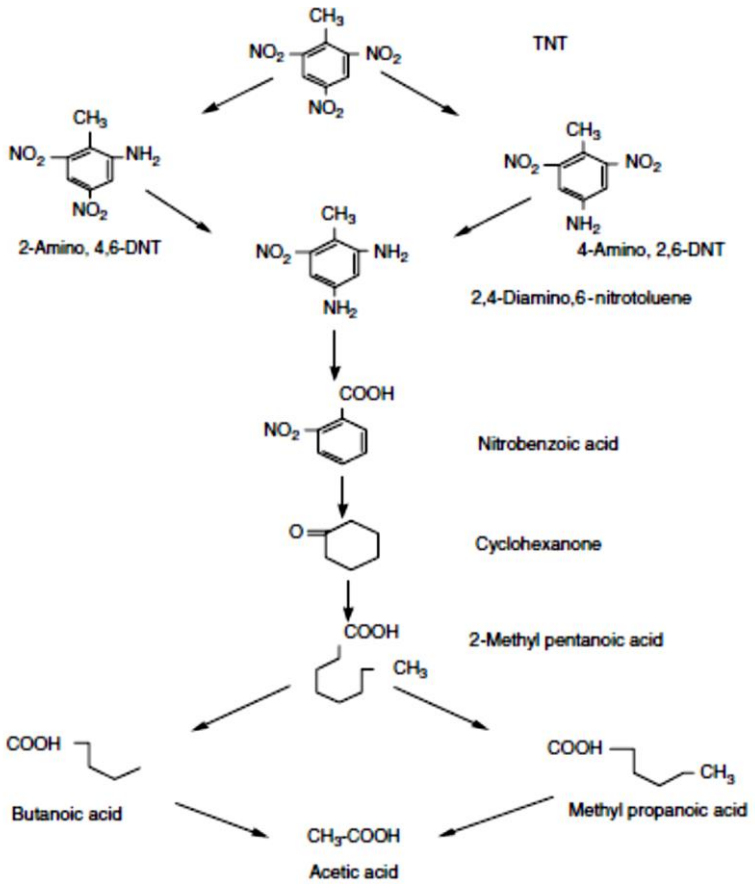
مطالعه با نشان‌دار کردن یکنواخت حلقه TNT با [^{14}C] در محیط کشتی که TNT تنها منبع کربن بود انجام شد. روش آزمایش بوپاتی و مانینگ (۱۹۹۶) در این‌جا نیز دنبال شد. نتایج در جدول ۸-۱ آمده است. داده‌ها نشان می‌دهند که در پایان ۳۰ روز آزمایش، متابولیت‌های گوناگون و زیست‌توده تولید شده است. در این آزمایش TNT معدنی نشد. زیرا دی‌اکسید کربنی تولید نشده اما بیشتر آن به اسید استیک (۴۹ درصد) تبدیل شده و ۲۷ درصد به صورت زیست‌توده جذب شد. به جز استات، اسید نیتروبنزویک (۶ درصد) و اسید بوتیریک (۹/۵ درصد) از دیگر واسطه‌های موجود در محیط بودند. در محیط شاهد، TNT تا اندازه‌ی کمی به 4-ADNT (۳٪) تبدیل شد اما حدود ۹۵ درصد آن به صورت دست‌نخورده بازیابی شد. مقدار بسیار کمی هم سیکلوهگزانون دیده شد که ۰/۰۱ درصد TNT [^{14}C] اولیه بود. آزمایش با TNT نشان‌دار، موازنه جرمی مناسب و بازیابی ۹۵ درصدی TNT [^{14}C] را نشان داد. از آن‌جا که کربن‌های حلقه TNT به صورت یکنواخت نشان‌دار شدند، تبدیل TNT به اسید استیک و اسید بوتیریک، نشان دهنده شکسته شدن حلقه است.

جدول ۸-۱ نتایج مطالعه TNT نشان‌دار: موازنه جرمی متابولیسم TNT با مجموعه باکتری‌های *دسولفوویبریو*

TNT [^{14}C] بازیافت شده	کشت فعال (درصد)	کنترل کشته شده (درصد)
دی‌اکسید کربن	۰	۰
زیست توده	۲۷/۴	۰
اسید استیک	۴۹/۵	۰
اسید نیتروبنزویک	۶/۲	۰
سیکلوهگزانون	۰/۰۱	۰
اسید بوتیریک	۹/۵	۰
اسید ۲- متیل پنتانوییک	۰/۲	۰
4-ADNT	۰/۵	۳/۲
4-ADNT	۰/۹	۰
2,4-DANT	۰/۷	۰
TNT	۰	۹۴/۵
بازیافت نشده	۵/۰۹	۲/۳

حضـور واسـطه‌های گوناگون در هردو محیط کشت (TNT تنها و TNT با پیرووات) بیانگر این اسـت که مجموعه‌ی باکتری‌ها آنزیم‌های ضـروری برای تجزیه TNT را دارند. مسـیر متابولیسـم بی‌هوازی مانند شـکل ۸-۳ برای TNT، توسـط باکتری‌های کاهنده سـولفات پیشـنهاد شده است. TNT ابتـدا به 4-ADNT و 2-ADNT کاهش یافته و در ادامه به 2,4-ADNT کاهش یافت. این کاهش با تولید سـولفید از سـولفات توسـط *دسـولفوویبریوها* انجام شد که توسط پروس و همکاران (۱۹۹۳) و گورونتزی و همکاران (۱۹۹۳) نشـان داده شـده است. پس از ۲۰ روز در محیط‌های با و بدون پیرووات، غلظت سـولفید به ترتیب ۱۰/۶ و ۳/۱ میلی‌مولار بود. بخش زیادی از تفاوت غلظت سـولفید در این دو محیط ممکن اسـت به دلیل فراهمی بیشـتر دهنده‌ی الکترون در محیط دارای پیرووات باشـد. متابولیت دیگری که شـناسـایی شد NB بود. شاید ۲ تا ۳ ماده حدواسط بین 2,4-ADNT و NB وجود داشـته باشـند که شـناسـایی نشده‌اند. ممکن است این ترکیب‌ها (واسطه‌ها) موقتی بوده و در آنالیز GC مشـخص نشـده باشند. NB به سیکلوهگزانون تبدیل شد. این مرحله با شـکستن حلقه انجام شد که در شرایط بی‌هوازی معمولاً با یک سری از واکنش‌های هیدروژنه شدن و دهیدروژنه شـدن (هاروود و گیبسـون، ۱۹۸۶) انجام می‌شـود و NB را به سـیکلوهگزانون تبدیل می‌کنـد. هاروود و گیبسـون (۱۹۸۶) گزارش کردند که در شـرایط بی‌هوازی *رودوسـودوموناس*

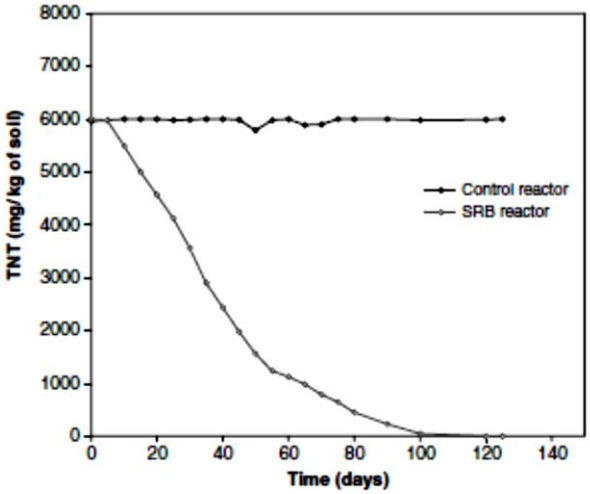
پالوستریس[1] با واکنش‌های دهیدروژناسیون و هیدراسیون از اسید بنزوییک، اسید پایملیک[2] تولید کرد. واسطه عمده دیده شده در پژوهش آن‌ها اسید سیکلوهگزانوییک بود. در ادامه سیکلوهگزانون به اسید ۲-متیل پنتانوییک تبدیل و از آن اسید بوتیریک ایجاد شد که در ادامه به اسید استیک تبدیل شد. مطالعه با TNT نشان‌دار تایید کرد که در متابولیسم TNT، دی‌اکسید کربن تولید نمی‌شود و فرآورده نهایی اسید استیک است. در شرایط بی‌هوازی، این اسید چرب به سادگی توسط باکتری‌های کاهنده سولفات و متانوژن استفاده کننده از استات از محیط حذف می‌شود.



شکل ۸-۳ مسیر متابولیکی پیشنهاد شده برای TNT توسط *دسولفوویبریوها*

1. *Rhodopseudomonas palustris*
2. Pimelic acid

استفاده از این مجموعه باکتری‌ها در تیمار خاک آلوده به TNT با جمع‌آوری نمونه از کارخانه مهمات‌سازی جولیت آرمی در ایلی‌نویز ایالات متحده انجام شد. این خاک دارای غلظت بسیار بالای TNT به مقدار ۶۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بود. رآکتور دوغابی خاک بی‌هوازی طبق کار پیشین بوپاتی و همکاران (۱۹۹۸) طراحی شد. شرایط بی‌هوازی در رآکتور با دمیدن گاز هلیوم در بالای آن حفظ شد. خاک آلوده با اتوکلاو استریل شد. دوغاب خاک (۱۰ درصد) با استفاده از آب سترون دارای ۲۰ mM سولفات سدیم به عنوان پذیرنده الکترون، ۱۵ mM پیرووات به عنوان کومتابولیت و ۵ mM کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن تهیه شد. مایه تلقیح ۵ درصد از پیش رشد کرده از مجموعه باکتری‌های کاهنده سولفات، برای شروع آزمایش زیست‌پالایی به رآکتور دوغابی خاک افزوده شد. رآکتور شاهد با شرایط همانند بالا بدون مایه تلقیح باکتری هم در نظر گرفته شد. آزمایش به مدت ۱۲۵ روز ادامه یافت. نتایج که در شکل ۸-۴ ارائه شده است نشان می‌دهد که مجموعه‌ی باکتری‌های کاهنده سولفات به طور موثری (درمقایسه با شاهد) TNT را حذف کرده‌اند. حذف TNT در رآکتور دارای باکتری نزدیک ۱۰۰ درصد بوده و در تیمار شاهد صفر بود. این آزمایش نشان داد که باکتری‌های کاهنده سولفات می‌توانند TNT را در شرایط بی‌هوازی حذف کنند. این مورد اولین گزارش درباره حذف TNT توسط باکتری‌های کاهنده سولفات در راکتور دوغاب خاک بود که می‌تواند کاربرد عملی قابل‌توجه‌ای در آلودگی‌زدایی خاک آلوده به TNT داشته باشد. بیشتر مکان‌های آلوده به مهمات را که در لایه سطحی خاک است می‌توان خاک‌برداری کرده و در رآکتور دوغاب خاک بی‌هوازی تیمار کرد.



شکل ۸-۴ غلظت TNT در رآکتور دوغاب خاک مایه‌زنی شده با *دسولفوویبریوها*

۸-۴- زیست‌پالایی خاک آلوده به مواد منفجره: مطالعه موردی

دو روش زیست‌پالایی به نام رآکتور دوغاب خاک و روش زمین‌پالایی برای تیمار خاک آلوده به مواد منفجره در کارخانه مهمات‌سازی ارتش لویزیانا (LAAP) واقع در میندن لویزیانا[1] مطالعه شد. خاک آلوده از مکان گفته شده در میدن لویزیانا جمع‌آوری شد. غلظت آلاینده در این خاک در جدول ۸-۲ آمده است. غلظت TNT در خاک از ۴۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ $mg\ kg^{-1}$، غلظت ماده منفجره با قابلیت شناسایی سریع[2] (RDX) ۸۰۰ تا ۱۹۰۰ $mg\ kg^{-1}$ و غلظت مواد منفجره با دمای ذوب بالا[3] (HMX) ۶۰۰ تا ۹۰۰ $mg\ kg^{-1}$ بود. مقدار ماده آلی کل خاک ۴ تا ۵ درصد بوده که شامل آلاینده‌ها هم می‌شود و میانگین pH آن ۶/۵ بود.

جدول ۸-۲ غلظت مواد منفجره در خاک آلوده

مواد منفجره	محدوده غلظت (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)
TNT	۴۰۰۰-۱۰۰۰۰
RDX	۸۰۰-۱۹۰۰
HMX	۶۰۰-۹۰۰

۸-۴-۱- روش‌های رآکتور دوغاب خاک و زمین‌پالایی

چهار رآکتور خاک غرقاب دو لیتری در مقیاس آزمایشگاهی طراحی و در دمای محیط (۲۰ تا ۲۲ °C) قرار گرفت. در این رآکتورها دوغاب ۲۰ درصدی (۲۰ گرم خاک در ۱۰۰ گرم آب) از خاک آلوده به مواد منفجره به دست آمده از کارخانه LAAP (میندن، لویزیانا، ایالات متحده) ریخته شد. دو رآکتور اول شاهد بوده و سوبسترایی دریافت نمی‌کردند. دو رآکتور دوم هر هفته یک بار ۰/۳ درصد (v/v) ملاس[4] به عنوان سوبسترا دریافت کردند. هوا از طریق پخش کننده و یک بار در روز به مدت ۱۰ دقیقه به سیستم اضافه می‌شد. دوغاب خاک به طور پیوسته با سرعت متوسط ۱۰۰ دور در دقیقه و با موتور همزن[5] مخلوط می‌شد. غلظت ماده منفجره، رشد باکتری، pH و اکسیژن محلول به صورت هفته‌ای در رآکتور بررسی شده و نتایج برای دو رآکتور میانگین گرفته شده و بیان شد.

1. Louisiana Army Ammunition Plant (LAAP) in Minden, Louisiana
2. Rapid detention explosive
3. High melting explosive
4. Grandma’s Molasses, Mott’s LLP, Cadbury Beverages Inc., Stanford, CT, USA
5. Model RW 20 DZM, Tekmar Company, Cincinnati, OH, USA

برای آزمایش زمین‌پالایی چهار سری کفه فلزی استفاده شد. یک سری تابه یا صفحه آلومینیومی با ابعاد ۸ در ۳/۷۵ در ۲/۳۷۵ اینچ بوده که روی تابه فولادی بزرگ با ابعاد ۹/۵ در ۵/۲ در ۲/۷ قرار گرفته بود. کف تابه کوچک‌تر با سوراخ‌هایی به قطر ۲ میلی‌متر و با فاصله ۴ سانتی‌متراز هم متخلخل شده بود تا پس از آب‌گیری، زهکشی شود. در هر تابه کوچک ۳۰۰ گرم خاک آلوده از LAAP (میندن، لویزیانا، ایالات متحده) ریخته شد. هر دو هفته یک بار، ۵۰۰ ml آب در چرخه خیسی به تابه افزوده می‌شد تا غرقاب شود و پس از ۲ هفته آب زهکش می‌شد تا سیستم دو هفته‌ی خشکی بگذراند و خاک خشک شود. در دو سری اول تابه‌ها ملاس اضافه نمی‌شد و در دو سری بعدی مانند آزمایش قبلی ۰/۳ درصد ملاس به عنوان سوبسترای همراه و هر دو هفته یک بار و در طی چرخه غرقاب افزوده می‌شد. در هر تابه یک بار در هفته هم‌خوردگی (شخم) ایجاد می‌شد. غلظت آلاینده منفجره و رشد باکتریایی هر هفته بررسی شده و نتایج در هر سری تابه‌های کنترل و تیمار میانگین گرفته می‌شد.

۸-۴-۲- آنالیزها

مواد منفجره خاک طبق روش توصیه شده مرکز پژوهش‌های زیست محیطی ارتش ایالات متحده عصاره‌گیری شد. دوغاب خاک در آون (۱۰۰ °C) خشک شد. سپس یک گرم از آن به ویال سرم ۱۵ ml منتقل شده و با ۹ ml استونیتریل عصاره‌گیری شد. درپوش تفلونی روی ویال گذاشته شده و برای ۱ دقیقه هم زده شد. سپس مخلوط ۱۸ ساعت در معرض امواج اولتراسونیک قرار گرفت و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه زمان داده شد تا ته‌نشین شود. یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته شده و به آن یک میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم (۵ $g\ l^{-1}$) در ویال شیشه‌ای اضافه شد. ویال با دست هم‌زده شده و ۱۵ دقیقه برای ته‌نشینی ثابت ماند و سپس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای آنالیز با HPLC[1] (Varian, Walnut Creek, CA, USA) برداشته شد. فاز موبایل مخلوط ۱:۱ متانول: آب، شدت تزریق ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۵۰ µl بود. اکسیژن محلول در دوغاب خاک به صورت هفته‌ای و پیش از انجام تهویه و توسط اکسیژن آنالایزر (YSI 5000, Yellow Springs, OH, USA) اندازه‌گیری شد. پروب آنالایزر مستقیماً در رآکتور قرار داده شده و غلظت اکسیژن اندازه‌گیری شده و به صورت $mg\ l^{-1}$

1. A liquid chromatograph equipped with two Model 210 solvent pumps, a Model 320 programmable multi-wavelength ultraviolet (UV) detector set at 254 nm, a Model 410 system auto sampler (Varian, Walnut Creek, CA, USA), and an LC-CN 4.6-mm-i.d. × 25-cm HPLC column (C-18 Supelco column) with a particle size of 5–6 mm.

بیـان شـــد. pH دوغـاب هم بـه صـــورت هفتـه‌ای با pH متر (UltraBasic UB-10, Denver Instrument) و با قرار دادن مستقیم پروب در رآکتور اندازه‌گیری شد.

فعالیت باکتری‌ها در رآکتور به صـورت هفته‌ای بررسـی شـد. نمونه دوغاب (یک میلی‌لیتر از هر رآکتور) در محلول بافر فسفات به صورت سریالی رقیق شده و با روش استاندارد شمارش روی پتری در محیط تریپتیک سـوی آگار[1] شمارش شد. مطالعه معدنی شدن TNT [^{14}C] هم انجام شد. پس از ۴۹ روز از گـذشـــت آزمایش، ۲۰ میلی‌لیتر دوغاب از هر رآکتور و ۱۰ گرم هم خاک خشـــک از تابه‌های زمین‌پالایی برداشـته شـد. نمونه‌ها در حضـور TNT نشـان‌دار شـده به صـورت یکنواخت انکوباسـیون شـد و موازنه جرمی بر اسـاس تولید فراسـنجه [^{14}C]CO_2 تعیین شد. به دوغاب خاک [^{14}C]TNT با شـــدت تجزیه ۲۰۰۰۰ در دقیقه[2] (dpm) در میلی‌لیتر دوغاب در ارلن رســـپیرومتر افزوده شـد. نمونه‌ها به صـورت دوره‌ای برداشـت شـده و مقدار TNT تبدیل شده به زیست توده با روش ماده رسـوبی در اسـید تری‌کلرو اسـتیک (TCA) و توسـط اسپکترومتر (Beckman (Palo model LS5000TD liquid scintillation spectrometer (Alto, CA, USA) اندازه‌گیری شد.

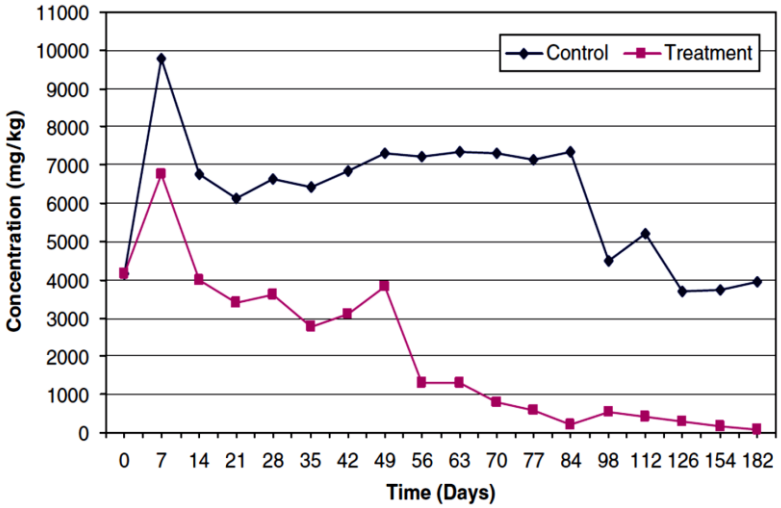
از ارلن رســـپیرومتر دارای TNT [^{14}C] برای ســـنجش دی‌اکســـید کربن بیرون آمده توســـط باکتری‌های خاک اسـتفاده به عمل آمد. این آزمایش به صـورت بی‌هوازی با رسپیرومتر تغییر یافته انجام شـد. هیدوکسـید پتاسیم (KOH) نیم مولار به بازوی جانبی اسپیرومتر افزوده شده و ارلن‌ها در دمای محیط و روی شـیکر با ۵۰ دور در دقیقه انکوباسـیون شـدند. سـپس از آن‌ها به صـورت دوره‌ای هیدروکســید پتاســیم برداشــت شــده و ویژگی رادیواکتیو آن با اســپکترومتر نشــر مایع اندازه‌گیری و هیدروکســید پتاســیم جایگزین شــد. درصــد TNT [^{14}C] معدنی شــده به صــورت [^{14}C] CO_2 محاسبه شد.

متـابولیت‌های TNT با جمع‌آوری بخش‌های آن پس از عبور از ســـتون HPLC در هر ۳۰ روز آنالیز شـدند. ویژگی رادیواکتیو در هر بخش با شمارش نشر مایع اندازه‌گیری شد. TNT رادیواکتیو جذب شـده به خاک با اسـتفاده از روش عصـاره‌گیری خاک که در بالا گفته شد، آنالیز شد و میزان رادیواکتیو در خاک با استفاده از اسپکترومتر نشر مایع اندازه‌گیری شد.

1. Tryptic soy agar
2. Disintegrations per minute

۸-۴-۳- نتایج

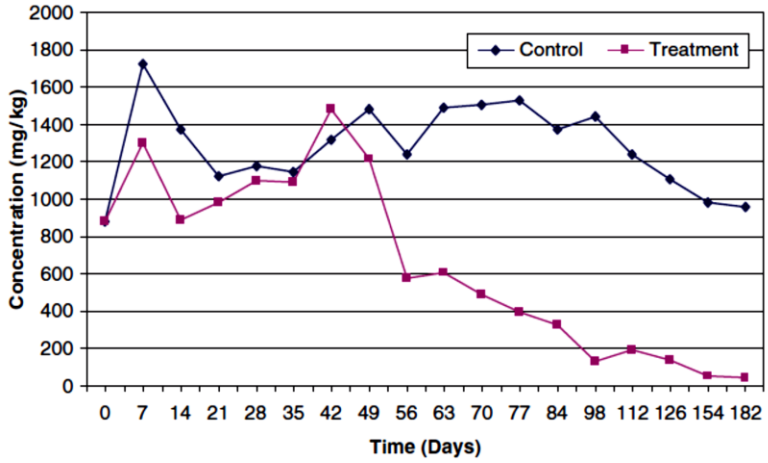
غلظت TNT در رآکتور دوغاب در شکل ۸-۵ آمده است. غلظت TNT خاک در رآکتور کنترل که کربن در آن حضور نداشته است، حدود ۷۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که در طول آزمایش در همان اندازه (بالا) ماند. این مشاهده نشان می‌دهد که میکروفلور بومی جایگاه آلوده بدون افزودن سوبسترای همراه یا عناصر غذایی تمایلی به تجزیه TNT نداشت. غلظت TNT خاک در تیماری که ملاس (سوبسترای همراه) دریافت کرد به تدریج کم شده و در ۱۸۲ روز آزمایش به زیر ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسید.



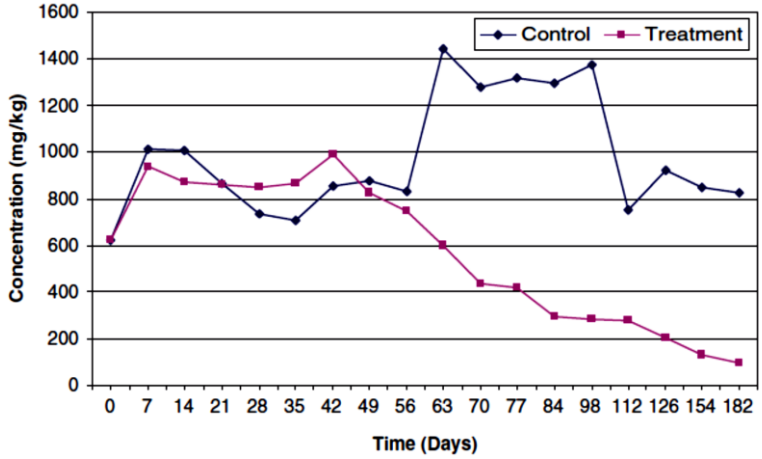
شکل ۸-۵ غلظت TNT در رآکتورهای دوغاب خاک

مطالعه پیشین ما نشان داد که حذف TNT در سیستم دوغاب خاک با افزودن کومتابولیت یعنی منبع مازاد کربن مانند ملاس یا سوکسینات انجام‌پذیر است (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۴b). ملاس منبع کارآمد کربن است که نسبت به دیگر منابع کربن شدت تجزیه TNT را افزایش چشم‌گیری می‌دهد (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۴b). این مطالعه نشان داد که رآکتورهای دوغاب خاک می‌توانند به طور کارآمدی TNT را در خاک آلوده پالایش کنند. اجرای رآکتور دوغاب خاک در مقیاس آزمایشگاهی در ۱۸۲ روز نشان داد که ۹۹ درصد از TNT قابل حذف است. همچنین در رآکتورهای دوغاب، سایر مواد منفجره مانند HMX و RDX هم حذف شدند (شکل ۸-۶ و ۸-۷) اما کارایی حذف آن‌ها به اندازه‌ی TNT نبود که می‌تواند به دلیل پیچیدگی این مولکول‌ها باشد.

همان‌گونه که در دیگر پژوهش‌ها (ویلیامز و همکاران، ۱۹۹۲؛ بوپاتی، ۲۰۰۱) نشان داده شده است، تجزیه HMX و RDX هم امکان‌پذیر بوده اما به زمان طولانی‌تری نیاز دارد.



شکل ۸-۶ غلظت HMX در راکتورهای دوغاب خاک



شکل ۸-۷ غلظت RDX در راکتورهای دوغاب خاک

افزایش TNT نشان‌دار به زیست توده موجود در رآکتور شواهدی از معدنی شدن TNT را نشان داد. به طوری‌که از TNT نشان‌دار اولیه (۲۰۰۰۰ dpm ml^{-1})، ۲۳ درصد به CO_2 و ۲۴ درصد به زیست توده میکروبی تبدیل شد. پژوهش‌های ردیابی در رآکتور، حضور حد واسطهای گوناگونی مانند ۴-آمینو-۲، ۶-دی‌نیتروتولوئن، ۲-آمینو-۴، ۶-دی‌نیتروتولوئن، ۲، ۴-دی‌آمینو-۶-نیتروتولوئن، اسیدهای چرب و دیگر متابولیت‌های شناسایی نشده را در سه هفته پس از شروع آزمایش نشان داد. عصاره‌گیری خاک با استونیتریل نشان داد که ۲ درصد از TNT به خاک جذب

شده و مابقی آن برای تبدیل به واسطه‌ها در نظر گرفته شدند. موازنه جرمی منطقی بود و ۹۸ درصد بازیابی TNT نشان‌دار را تایید کرد. در تیمار شاهد بدون کربن، ۷۸ درصد از TNT نشان‌دار به صورت تجزیه نشده (یا وارد فرایند تجزیه نشده) بازیابی شد. مطالعه ردیابی نشان داد که باکتری‌های بومی خاک آلوده می‌توانند در شرایط بهینه، سبب تجزیه گسترده TNT در زمان منطقی شوند. تجزیه TNT با معدنی شدن TNT نشان‌دار، تشکیل متابولیت و حضور مواد رادیواکتیو در زیست‌توده میکروبی (به صورت مواد رسوب یافته در TCA) تایید شد. pH رآکتورها در طول آزمایش بررسی شد. pH در تیمار شاهد بدون کربن نزدیک خنثی بوده اما در تیمار دارای ملاس اسیدی شد (pH = ۵). غلظت اکسیژن محلول[1] (DO) هم در رآکتور دوغاب هفتگی بررسی شده که در تیمار کنترل در ۶/۵ $mg\ l^{-1}$ ثابت ماند و در تیمار ملاس کمتر از ۱ $mg\ l^{-1}$ بود.

در طول آزمایش چند بار کشت باکتری انجام شد. شمار باکتری‌ها در تیمار ملاس بیشتر از تیمار کنترل بود (جدول ۸-۳). این نتایج ارزش افزودن ملاس را هم نشان می‌دهد که به افزایش جمعیت باکتری‌های خاک در رآکتور کمک می‌کند. از بین سوبستراهای گوناگون مطالعه شده مانند سوکسینات، گلوکز، استات و سیترات، ملاس بهتر است (بوپاتی و همکاران، ۱۹۹۴b). زیرا در آن تعادل مناسبی از عناصر غذایی شامل کربن، نیتروژن، فسفر، ویتامین‌ها و عناصر معدنی برای فعالیت باکتری‌ها وجود دارد.

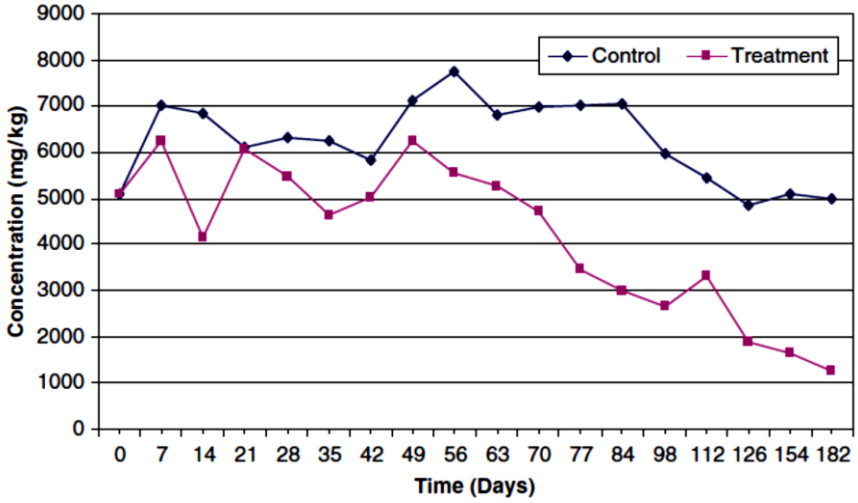
جدول ۸-۳ شمار باکتری‌ها در راکتورهای دوغاب خاک[a]

روزهای تیمار	کنترل ($CFU\ ml^{-1}$)	تیمار ($CFU\ ml^{-1}$)
۰	۷۲×۱۰^{۲}	۸۱×۱۰^{۲}
۱۴	۳۳×۱۰^{۷}	۵۳×۱۰^{۷}
۲۸	۴۶×۱۰^{۵}	۱۶۷×۱۰^{۶}
۴۲	۶۰×۱۰^{۵}	۲۳۵×۱۰^{۶}
۵۶	۴۷×۱۰^{۵}	۵۵×۱۰^{۶}
۷۰	۱۲۳×۱۰^{۴}	۳۶×۱۰^{۶}
۸۴	۱۸۷×۱۰^{۴}	۱۰۳×۱۰^{۶}
۹۸	۹۳×۱۰^{۴}	۵۹×۱۰^{۶}
۱۱۲	۱۷۳×۱۰^{۴}	۱۰۵×۱۰^{۶}
۱۲۶	۸۸×۱۰^{۴}	۷۸×۱۰^{۶}
۱۵۴	۶۷×۱۰^{۴}	۱۰۴×۱۰^{۶}
۱۸۲	۷۲×۱۰^{۴}	۱۲۱×۱۰^{۶}

[a] اطلاعات بیانگر میانگین دو پلیت هستند

1. Dissolved oxygen

در روش زمین‌پالایی از تابه‌های ۱ تا ۴، نمونه خاک برای تعیین غلظت TNT در طول ۱۸۲ روز آزمایش گرفته شد که در شکل ۸-۸ آمده است. در هر نمونه‌برداری، سه نمونه از هر تابه گرفته شده، آنالیز شده و غلظت میانگین ترسیم شد. غلظت TNT در تابه کنترل در طول آزمایش در اندازه بالا ماند. تیماری که ملاس دریافت کرده بود، از نظر زیستی فعال بوده و حذف TNT را نشان داد. در این تیمار غلظت اولیه TNT که حدود $mg\ kg^{-1}$ ۷۰۰۰ بود، پس از ۱۸۲ روز به کمتر از ۱۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسید که به معنای حذف ۸۲ درصد از TNT است.در هر دو تابه کنترل و ملاس مقدار بسیار کمی از RDX و HMX حذف شد (داده‌ها منتشر نشده‌اند). شدت تجزیه RDX و HMX بسیار پایین بوده و در شرایط ادامه آزمایش تا بیش از ۳۰۰ روز ممکن است کاهش چشم‌گیر در غلظت آن‌ها دیده شود (بوپاتی، ۲۰۰۱).



شکل ۸-۸ غلظت TNT در تابه‌های زمین‌پالایی

بررسی نشان‌دار بودن کربن در زیست توده گرفته شده از تابه‌ها معدنی شدن TNT را نشان داد. در تابه‌هایی که ملاس دریافت کرده بودند مقدار CO_2 نشان‌دار ۶/۵ درصد و در تیمار کنترل ۱/۲ درصد بود که به طور واضح نشان می‌دهد TNT توسط باکتری‌های خاک در تیمار دارای ملاس معدنی شده است. آنالیز مواد قابل رسوب در TCA نشان داد که مقدار چشم‌گیری از TNT نشان‌دار به زیست توده سلولی تبدیل شده است. متابولیت‌های گوناگون TNT در درجات مختلف هم وجود داشتند. موازنه جرم محاسبه شده بسیار منطقی بود و بازیابی ۹۸ درصد از TNT نشان‌دار

در این آزمایش را نشان داد. نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که در تابه‌های کنترل، به دلیل نبود ملاس به عنوان سوبسترای همراه، زیست توده فعال برای تبدیل TNT به CO_2 وجود نداشته است.

در طول آزمایش چند بار کشت باکتری در نمونه‌های خاک گرفته شده از تابه‌ها انجام شد. شمار باکتری‌ها در خاک تابه‌هایی که ملاس دریافت کرده بودند، بیشتر از تیمار کنترل بود (جدول ۸-۴). این نتایج همچنین نشـان داد که در تیمار کنترل شمار باکتری‌ها CFU/g $۱۰^۴$ خاک بود که نشان می‌دهد از نظر زیسـتی غیرفعال نبوده اسـت. اما با این وجود تجزیه زیسـتی TNT در تیمار کنترل ناچیز بود. زیرا غلظت آن در طول آزمایش در حد بالایی ثابت ماند.

جدول ۸-۴ شمار باکتری‌ها در پن‌های زمین‌پالایی[a]

روزهای تیمار	کنترل (CFU/g soil)	تیمار (CFU/g soil)
۰	۶۳×۱۰^۲	۷۴×۱۰^۲
۱۴	۵۸×۱۰^۶	۴۶×۱۰^۶
۲۸	۴۱×۱۰^۵	۴۴×۱۰^۶
۴۲	۴۰×۱۰^۵	۸۸×۱۰^۶
۵۶	۳۲×۱۰^۴	۱۵۸×۱۰^۵
۷۰	۶۳×۱۰^۴	۶۰×۱۰^۶
۸۴	۲۷۳×۱۰^۴	۱۲۹×۱۰^۶
۹۸	۷۳×۱۰^۴	۱۱۲×۱۰^۶
۱۱۲	۲۲۰×۱۰^۴	۱۶۲×۱۰^۶
۱۲۶	۱۸۸×۱۰^۴	۱۱۹×۱۰^۶
۱۵۴	۱۱۲×۱۰^۴	۶۷×۱۰^۶
۱۸۲	۲۳×۱۰^۴	۸۷×۱۰^۶

[a] اطلاعات بیانگر میانگین دو پلیت هستند

بین دو روش گوناگون زیست‌پالایی، سیستم دوغاب خاک در حذف TNT خاک LAAP میدن لویزیـانا کارآمدتر بود. روش زمین‌پالایی هم TNT را حذف کرد، اما شـــدت حذف درآن پایین بود. این روش به صـــورت میدانی اگر اجرا شـــود باید طوری طراحی شـــود (در یک یاخته) که امکان شـــسـته‌شـدن زهاب و رسیدن آن به آب زیرزمینی وجود نداشته باشد. هر دو روش نشان دادند که بـاکتری‌هـای بومی خـاک آلوده قـادر به معدنی کردن TNT هســـتند. برتری رآکتور دوغاب خاک شـرایط اجرایی سـاده آن اسـت. این روش تنها نیاز به مخلوط کردن، تامین هوا و منبع کربن دارد.

ملاس منبع کربن ارزانی است که در عملیات در مقیاس بزرگ، مقرون به صرفه است. بر اساس این پژوهش، از رآکتور دوغاب خاک برای پالایش کارآمد و سریع TNT در خاک LAAP میدن لویزیانا می‌توان استفاده کرد. با انکوباسیون خاک در دراز مدت نیز می‌توان HMX و RDX را در این خاک حذف کرد.

منابع

Angermeier L, Simon H (1983) On the reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds by Clostridia, the role of ferredoxin and its stabilization. Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem 366:961–975.

Bak F, Widdel F (1986) Anaerobic degradation of indolic compounds by sulfate reducing enrichment cultures and description of Desulfobacterium indolicum gen. nov. sp. Arch Microbiol 146:170–176.

Battersby NS, Wilson V (1989) Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. Appl Environ Microbiol 55:433–439.

Beller HR, Grbic-Galic D, Reinhard D (1992) Microbial degradation of toluene under sulfate reducing conditions and the influence of iron on the process. Appl Environ Microbiol 58:786–793.

Berry DF, Francis AF, Bellag JM (1987) Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. Arch Microbiol 112:115–117.

Boopathy R, Daniels L (1991) Isolation and characterization of a furfural degrading sulfate reducing bacterium isolated from an anaerobic digester. Curr Microbiol 23:327–332.

Boopathy R, Kulpa CF (1992) Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate reducing bacterium Desulfovibrio sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. Curr Microbiol 25:235–241.

Boopathy R, Kulpa CF, Wilson M (1993a) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by Desulfovibrio sp. (B strain). Appl Microbiol Biotechnol 39:270–275.

Boopathy R. Wilson M, Kulpa CF (1993b) Anaerobic removal of 2,4,6-trinitrotoluene under different electron-accepting conditions: laboratory study. Water Environ Res 65:271–275.

Boopathy R, Kulpa CF (1993b) Nitroaromatic compounds serve as nitrogen source for Desulfovibrio sp. (B strain). Can J Microbiol 39:430–433.

Boopathy R, Manning J, Montemagno C, Kulpa CF (1994a) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a Pseudomonas consortium under aerobic conditions. Curr Microbiol 28:131–137.

Boopathy R,Wilson M, Montemagno C, Manning J, Kulpa CF (1994b) Biological transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by soil

bacteria isolated from TNT-contaminated soil. Biores Technol 47:19–24.

Boopathy R, Kulpa CF (1994) Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by a Methanococcus sp. (strain B) isolated from a lake sediment. Can J Microbiol 40:273–278.

Boopathy R (1994) Transformation of nitroaromatic compounds by a methanogenic bacterium Methanococcus sp. (strain B). Arch Microbiol 162:167–172.

Boopathy R, Manning JF (1996) Characterization of partial anaerobic metabolic pathway for 2,4,6-trinitrotoluene degradation by a sulfate-reducing bacterial consortium. Can J Microbiol 42:1203–1208.

Boopathy R, Manning, J, Kulpa CF (1998) A laboratory study of the bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor. Water Environ Res 70:80–86

Boopathy R (2000) Bioremediation of explosives contaminated soil. Int Biodeterior Biodegradation 46:29–36.

Boopathy R (2001) Bioremediation of HMX-contaminated soil using soil slurry reactors. Soil Sedim Contam 10:269–283.

Boopathy R (2002) Effect of food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil. J Hazard Material 92:103–114.

Boyd SA, Shelton DR, Berry D, Tiedje JM (1983) Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. Appl Environ Microbiol 46:50–54.

Bruhn C, Lenke H, Knackmuss HJ (1987) Nitro substituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. Appl Environ Microbiol 53:208–210.

Carpenter DF, McCormick NG, Cornell JH, Kaplan, AM (1978) Microbial transformation of 14C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene in activated sludge system. Appl Environ Microbiol 35:949–954.

Dickel O, Knackmuss HJ (1991) Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by Rhodococcus sp. QT-1. Arch Microbiol 157:76–79.

Duque E, Haidour A, Godoy F, Ramos JL (1993) Construction of a Pseudomonas hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. J Bacteriol 175:2278–2283.

Edwards EA, Wills LE, Reinhard M, Grbic-Galic D (1992) Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. Appl Environ Microbiol 58:794–800.

Evans WC, Fuchs F (1987) Anaerobic degradation of aromatic compounds. Annu Rev Microbiol 42:289–317.

Fernando T, Bumpus JA, Aust SD (1990) Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol 56:1666–1671.

Fewson CA (1981) Biodegradation of aromatics with industrial relevance. In: Leisenger T, Cook AM, Huttler R, Nuesch J (Eds) Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic, London, pp 141–179.

Funk SB, Roberts DJ, Crawford DL, Crawford RL (1993) Initial-phase optimization for bioremediation of munitions compounds-contaminated soils. Appl Environ Microbiol 59:2171–2177.

Geissler JF, Harwood CS, Gibson J (1988) Purification and properties of benzoate coenzyme. A. ligase, a Rhodopseudomonas palustris enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. J Bact 170:1709–1714.

Gorontzy T, Kuver J, Blotevogel KH (1993) Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. J Gen Microbiol 139:1331–1336.

Haigler BE, Spain JC (1993) Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. Appl Environ Microbiol 59:2239–2243.

Hallas L, Alexander M (1983) Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluents. Appl Environ Microbiol 57:3156–3162.

Harwood CS, Gibson J (1986) Uptake of benzoate by Rhodopseudomonas palustris grown anaerobically in light. J Bacteriol 165:504–509

Holland KT, Knapp JS, Shoesmith JG (1987) Anaerobic bacteria. Chapman and Hall, New York, p 46.

Kaplan DL, Kaplan AM (1982) Mutagenicity of 2,4,6-trinitotoluene surfactant complexes. Bull Environ Contam Toxicol 28, 33–38.

Keith SM, Herbert RA (1983) Dissimilatory nitrate reduction by a strain of Desulfovibrio desulfuricans. FEMS Microbiol Lett 18:55–59.

Knoll G, Winter J (1989) Degradation of phenol via carboxylation of benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 30:318–324.

LeGall J, Fauque G (1988) Dissimilatory reduction of sulfur compounds. In: Zehnder AJB (ed) Biology of anaerobic microorganisms. Wiley, New York, pp 587–639.

Liu MC, Peck HD (1981) The isolation of a hexaheme cytochrome from Desulfovibrio desulfuricans and its identification as a new type of nitrite reductase. J Biol Chem 256:13159–13164.

Liu MC, Peck HD (1988) Ammonia forming dissimilatory nitrite reductases as a homologous group of hexaheme-c-type cytochromes in metabolically diverse bacteria. pp 685–691. In:

Kauf K, von Dohren, K, Peck HD (eds) The roots of modern biochemistry. Walter de Gruyter, Berlin.

McCormick N, Feeherry FE, Levinson HS (1976) Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Appl Environ Microbiol 31:949–958.

McCormick NG, Cornell JH, Kaplan AM (1981) Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro- 1,3,5-triazine. Appl Environ Microbiol 42:817–823.

Michels J, Gottschalk G (1994) Inhibition of the lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl Environ Microbiol 60:187–194.

Naumova PR, Selivanovskay SY, Mingatina FA (1986) Possibility of deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. Mikrobiologiya 57:218–222.

Nishino SF, Spain JC (1993) Degradation of nitrobenzene by a Pseudomonas pseudoalcaligenes. Appl Environ Microbiol 59:2520–2525.

Preuss A, Fimpel J, Diekert G (1993) Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Arch Microbiol 159:345–353.

Schnell S, Bak F, Pfennig N (1989) Anaerobic degradation of aniline and dihydroxy-benzenes by newly isolated sulfate reducing bacteria and description of Desulfobacterium anilini. Arch Microbiol 152:556–563.

Schnell S, Schink B (1991) Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoylCoA in Desulfobacterium anilini. Arch Microbiol 155:183–190.

Schnell S, Schink B (1992) Anaerobic degradation of 3-aminobenzoate by a newly isolated sulfate reducer and a methanogenic enrichment culture. Arch Microbiol 158:328–334.

Spain JC, Gibson DT (1991) Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a Moraxella sp. Appl Environ Microbiol 57:812–819.

Spanggord RJ, Spain JC, Nishino SF, Mortelmans KE (1991) Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a Pseudomonas sp. Appl Environ Microbiol 57:3200–3205.

Spiker JK, Crawford DL, Crawford RL (1992) Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol 58:3199–3202.

Steenkamp DJ, Peck HD (1981) On the proton translocation association with nitrite respiration in Desulfovibrio desulfuricans. J Biol Chem 256:5450–5458.

Szewzyk U, Schink B (1989) Degradation of hydroquinone, gentisate and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. Arch Microbiol 151:541–545.

Tschech A, Schink B (1986) Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures. Arch Microbiol 145:396–402.

Tschech A, Schink B (1988) Methanogenic degradation of anthranilate (2-aminobenzoate). Syst Appl Microbiol 11:9–12.

Tschech A, Fuch G (1989) Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxy benzoate: in vitro study of isotope exchange between $14CO_2$ and 4-hydroxybenzoate. Arch Microbiol 152:594–599.

Tschech A (1989) Der anaerobe Annau von aromatischen Verbindungen. For Mikrobiol 12:251–261.

Valli K, Brock BJ, Joshi DK, Gold MH (1992) Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignindegrading fungus Phanerochaete chrysosporium. Appl Environ Microbiol 58:221–228.

Vega JM, Kamin H (1977) Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a sirohemecontaining iron–sulfur enzyme. J Biol Chem 252:896–909.

Widdel F (1988) Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder AJB (ed) Biology of anaerobic microorganisms. Wiley, New York, pp 469–585.

Widdel F, Hansen TA (1992) The dissimilatory sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W,

Schleifer KH (eds) The Prokaryotes. 2nd edn. Springer, New York, pp 583–624.

Won DW, Disalvo, LH, Ng J (1974) Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl Environ Microbiol 31:576–580.

Wyman JF, Guard HE, Won WD, Quay JH (1979) Conversion of trinitrophenol to a mutagen by Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol 37:222–226.

Zeigler K, Braun K, Bockler A, Fuchs G (1987) Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying Pseudomonas strain. Arch Microbiol 149:62–69.

Zeyer J, Kearney PC (1984) Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a Pseudomonas putida. J Agri Food Chem 32:238–242.

فصل نهم

پالایش زیستی آلاینده‌های نفتی

Ramesh Chander Kuhad and Rishi Gupta

۹-۱- مقدمه

تمامی عملیات در صنعت نفت، مانند فعالیت‌های اکتشاف و تولید نفت، حمل و نقل، پالایش، جابه‌جایی و حمل و نقل فرآورده‌های پالایش شده و مدیریت ضایعات نفتی منابع بالقوه آلودگی آب، خاک و هوا هستند. نشت نفت خام که در طول حمل و نقل اتفاق می‌افتد و ضایعات پالایشگاهی، تهدیدی جدی برای محیط زیست است. افزایش آلودگی زیست محیطی، از طریق نفوذ فرآورده‌های نفتی در آب و خاک (زمین)، به شکل فزاینده‌ای سبب بدتر شدن کیفیت محیط زیست شده است. گزینه‌های مختلفی برای پالایش و مهار ضایعات نفتی وجود دارد. استفاده از روش‌های متداول شامل جذب سطحی نفت نشت یافته از آب‌ها، حفاری و کاربرد روش‌های پالایش فیزیکی، شیمیایی یا زیستی هستند. البته اقدامات موثرتر پالایشی و بازسازی شرایط محیطی به طور پیوسته دنبال می‌شوند. از میان فن‌آوری‌های مختلف برای پالایش آلاینده‌های هیدروکربنی (نفتی)، روش‌های پالایش زیستی کم هزینه‌ترین به شمار می‌آیند.

زیست‌پالایی از ریزجانداران یا گیاهان برای پاک‌سازی مکان‌های آلوده استفاده می‌کند. از اصول هیدرولوژیکی و مهندسی برای طراحی یک روش زیست‌پالایی استفاده می‌شود. بسیاری از ریزجانداران می‌توانند فعالیت‌های متابولیکی خود را برای استفاده از آلاینده‌های آلی سمی به عنوان منابع غذایی تطبیق دهند و بدین وسیله ترکیب‌های آلی پیچیده را به ترکیب‌های ساده‌تر، دی‌اکسید کربن و آب، معدنی کنند. روش‌های غیرزیستی به طور کارآمدی با روش‌های زیستی برای افزایش تجزیه زیستی ترکیب‌های آلی مقاوم، ترکیب شده‌اند (وَن‌هام و همکاران،۲۰۰۳؛ برار و همکاران، ۲۰۰۶). تجزیه میکروبی نفت خام مقرون به صرفه و از نظر زیست محیطی سالم است و بنابراین اغلب بهترین روش برای حذف نفت از محیط آلوده به شمار می‌رود (دِلورنزو، ۲۰۰۶؛ دِکارسر، ۲۰۰۷). ریزجانداران بومی موجود در مکان آلوده اغلب توسط سطح سمی این آلاینده‌ها مهار می‌شوند یا اغلب توانایی‌های متابولیکی مورد نیاز برای تجزیه کامل آلاینده‌های نفتی را دارا نیستند (فورسیت و همکاران، ۱۹۹۵؛ میشرا و همکاران، ۲۰۰۱a). در چنین مواردی، زیست‌پالایی نفت آلوده کننده به وسیله کاربرد ریزجانداران تقویت یا اصلاح ژنتیکی شده کارایی و سرعت تخریب را افزایش می‌دهد.

۹-۲- سرنوشت هیدروکربن‌ها در خاک

نفت خام از چهار بخش بزرگ شامل آلکان‌ها، آروماتیک‌ها، ترکیب‌های اکسیژن- سولفور- نیتروژن (NSO) و بخش آسفالتین تشکیل می‌شود. بخش آلکان اغلب دارای هیدروکربن‌های اشباع است، که می‌تواند از متان تا ترکیب‌هایی با طول زنجیره کربن ۴۰ یا بیشتر را شامل شود که می‌توانند یا

به صورت زنجیره خطی و یا دارای زنجیره جانبی باشند (اِسکلین، ۲۰۰۶). بخش آروماتیک دارای هیدروکربن‌های حلقوی است که از بنزن تا ساختارهای آروماتیک چند حلقه‌ای را شامل می‌شود. این مواد از مشتقات هیدروکربن‌های نیتروژن‌دار، گوگردی و اکسیژنی تشکیل شده‌اند و خودشان از طریق واکنش‌های زمین‌شیمی ترکیب‌های کربنی با ترکیب‌های گوگرد یا نیتروژن معدنی ساخته شده‌اند. مقاوم‌ترین بخش نفت خام بخش آسفالتین است که دارای هیدروکربن‌های بلندتر بوده و عمدتاً از پیوند عرضی واحدهای NSO تشکیل شده است (سالانیترو، ۲۰۰۱). نفت‌های سبک معمولاً دارای مقادیر بالایی از هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک، و بخش کوچک‌تری از رزین‌ها و آسفالتین‌ها هستند. نفت‌های سنگین، از تجزیه زیستی نفت خام در شرایط بی‌هوازی و در محل مخازن نفت تشکیل شده و مقادیر کم‌تری از هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک و نسبت بالاتری از ترکیب‌های شیمیایی قطبی، رزین‌ها و آسفالتین‌ها را دارا هستند.

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH ها) مانند نفتالین، کرایسن، فنانترن، بنزو(a) پایرن و سایرین و ترکیب‌های BTEX (بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن) به عنوان آلاینده‌های دارای ارجحیت توسط US EPA ذکر شده‌اند. ترکیب‌های PAH و BTEX از طریق فرایند همراه با سوخت‌های بنزینی و نفتی در چاه‌های نفت و پالایشگاه‌ها، پساب‌های صنعتی، فعالیت‌های پردازش چوب، و ساخت آفت‌کش‌ها، مواد شوینده، مواد شیمیایی، رنگ و جلا وارد خاک و هوا می‌شوند. آن‌ها همچنین از طریق نشت مخازن ذخیره زیرزمینی، و نشت در حین حمل و نقل منتقل می‌شوند. از آن‌جا که بیشتر این مواد در زیست‌بوم به سبب حلالیت آبی‌کم، پایداری شیمیایی ذاتی بالا، و مقاومت بالا به تجزیه، بسیار پایدار هستند، بنابراین گروه اصلی آلاینده‌های خاک و آب زیرزمینی را تشکیل می‌دهند (حسین، ۲۰۰۸). سرنوشت هیدروکربن‌ها در خاک توسط عوامل مختلفی در رابطه با محیط خاک و همچنین ویژگی‌ها و مشخصات شیمیایی ترکیب مدیریت می‌شود (آلکساندر، ۲۰۰۰). زیست فراهمی و تجزیه زیستی PAH ها و BTEX توسط توزیع و جزءبندی آلاینده‌ها در ذرات خاک، و افزایش سن خاک آلوده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. برهم‌کنش‌های زیاد در سطح مشترک ذرات آلی و معدنی و از طریق ساز و کارهای جذب و واجذب رخ می‌دهد که می‌تواند به شدت حرکت آلاینده‌ها و فراهمی آن‌ها برای دگرگونی زیستی و غیرزیستی را تحت تاثیر قرار دهد.

یک مسوکوزم[1] مزرعه‌ای بسته که از خاک آلوده تهیه شده بود شواهدی ارائه داده که نشان می‌دهد دامنه تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها تا اندازه زیادی تحت تاثیر ترکیب مولکولی آلودگی خاک قرار می‌گیرد (هوسمن، ۱۹۹۵). بر اساس این نتایج، یک الگوریتم پیش‌بینی برای برآورد دامنه

1. Mesocosm

تجزیـه زیســـتی، مبنی بر میـانگین کـاهش ۸۶ کلاس هیـدروکربنی مجزا و غلظت‌های اولیه آن‌ها توسعه داده شد. فورسیت و همکاران (۱۹۹۵) ثابت کردندکه هنگامی‌که جمعیت ریزجانداران تجزیه کننده هیدروکربن در خاک بیشتر از CFU $۱۰^۵$ در هر گرم خاک باشد زیست‌پالایی چشم‌گیری رخ می‌دهد. در پژوهشـی دیگر، تیمار زیسـت‌پالایی که شامل آهک‌دهی، کوددهی، و خاک‌ورزی بود در مقیاس آزمایشگاهی برای کارایی روش‌ها در پاک‌سازی یک خاک شنی، یک خاک لومی و یک خاک رسـی آلوده به بنزین، سـوخت جت، روغن گرمایش[1]، روغن دیزل، یا نفت کوره (مازوت)، با جمعیت میکروبی بومی مورد ارزیابی قرار گرفت (سُـنگ و همکاران، ۱۹۹۰). مشـخص شـد که نفت کوره از نظر سـاختاری سـخت تجزیه‌شونده است به طوری که حتی پس از یک سال انکوباسیون حدود ۸۰ درصد هیدروکربن باقی‌مانده آن پایدار است.

۹-۳- تنوع میکروبی و تجزیه زیستی

تجزیه زیسـتی نفت خام یک فرایند طبیعی اسـت. تغییرات ناشـی از عوامل فیزیکی، شـیمیایی و زیسـتی در ترکیب هیدروکربن‌های آلاینده، در مجموع به عنوان هوادیدگی شـناخته شده‌اند. شمار زیـادی از ریزجانداران از جنس‌های گوناگون می‌توانند از هیدروکربن‌ها به عنوان تنها منبع کربن و انرژی اسـتفـاده کننـد و این ریزجانداران به طور گسـترده در طبیعت توزیع شـده‌اند (وَن‌هام و همکـاران،۲۰۰۳). هیـدروکربن‌هـا در محیط طبیعی توسـط گروهی متنوع از بـاکتری‌ها، مخمر و قارچ‌های رشـته‌ای، جلبک، سـیانوباکترها و برخی از پروتوزوآها تجزیه زیسـتی می‌شـوند (پائول و همکاران، ۲۰۰۵). بیشـتر باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها از گرم-منفی‌ها هسـتند. بارتا و بوسـرت (۱۹۸۴) فهرسـتی از ۲۲ جنس بـاکتری و ۳۱ جنس قـارچ تجزیـه کننـده هیدروکربن جداسازی‌شده از خاک را تهیه کردند. سنگ و همکاران (۱۹۸۶) در یک مطالعه‌ی مقایسه‌ای تجزیه هیدروکربن توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها، دریافتند که ۸۲ درصد از معدنی شدن اِن- هگزادکان در یک توده شنی آلوده به باکتری‌ها اختصاص داشت، در حالی‌که تنها ۱۴ درصد ناشی از قارچ‌ها بود.

بر اسـاس گزارش‌های منتشـر شـده در مقاله‌ها، در میان رایج‌ترین وکارآمدترین باکتری‌های تجزیـه‌کننـده هیـدروکربن هم در خـاک و هم در محیط‌هـای دریـایی گونه‌هایی از *آسـینتوباکتر*، *سـودوموناس*، *آلکالیجنز*، *آرتروباکتر*، *آکروموباکتر*، *باسـیلوس*، *فلاووباکتریوم* و *نوکاردیا*، و در میان مخمرها *آئروبازیدیوم*[2]، *کاندیدا*، *رودوترولا*[3] و *اسـپوروبُلمجرز*[4] حضـور دارند. از قارچ‌ها نیز گونه‌های

1. Heating oil
2. *Aureobasidium*
3. *Rhodotorula*
4. *Sporobolomgers*

غالب شـــامل *تریکودرما*، *مورتیرلا*، *پنی‌ســـیلیوم* و *آســـپرژیلوس* هســـتند (لیحی و کُل‌ول، ۱۹۹۰). گونه‌هایی از *آســـپرژیلوس*، *پنی‌ســـیلیوم* و *فانروکیت*[1] که قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها بودند هم بارها از هر دو نوع محیط جداسازی شده‌اند. در یک آزمایش پالایشی موفق، دپوکردن زیستی ویژگی‌های میکروبی خـاک یک *باســـیلوس*، دو *کورینه باکتریوم*، و ســـه گونه *میکروکوکوس* را از باکتری‌های گرم-مثبت نشان داد و *انتروباکتر آمنیجنوس*[2]، *انتروباکتر کلوآکا*[3]، و گونه‌های *سودوموناس* به عنوان باکتری‌های گرم-منفی اصلی موجود در خاک‌ها تشخیص داده شدند (ای‌توربی و همکاران، ۲۰۰۷).

در طول ده سال گذشته، باکتری‌های دریایی شگفت‌انگیز زیادی جداسازی شده و مشخص شده کـه از هیدروکربن‌ها به عنوان تنها منبع کربن اســـتفاده می‌کنند (هد و همکاران، ۲۰۰۶). برخی از نمونه‌ها شـامل گونه‌های *آلکانی‌وراکس*، *سیکلوکلاستیکوس*، *اُلیفیلوس*[4]، *اُلیســـپیرا*[5]، *تالاســـولیتوس*[6] برخی از اعضـای جنس *پلانومیکروبیوم*[7] (پیش‌تر با نام *پلانوکوکوس*[8] شـناخته می‌شـدند) هســـتند. گونه‌های *آلکانی‌وراکس*، *اُلیفیلوس*، *اُلیســـپیرا*، *تالاســـولیتوس* و *پلانومیکروبیوم* از انواع مختلفی از هیدروکربن‌های اشـــباع خطی و شـــاخه‌دار (منشـــعب) اســـتفاده می‌کنند. در حالی‌که گونه‌های *سیکلوکلاستیکوس* می‌توانند طیفی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را استفاده کنند.

انتخاب جمعیت میکروبی توســـط ویژگی‌های آلاینده‌ای که پالایش می‌شـــود، تعیین می‌شـــود. چـالش مشـــخص کردن نقش تعداد جانداران در تجزیه آلاینده‌های موجود در محیط طبیعی کاملاً اسـاسی است. آنالیز ساختار جمعیت میکروبی و تغییرات آن در طول فرایندهای تجزیه زیستی مهم اســـت. این پژوهش‌ها می‌توانند دیدگاه کلی را در رابطه با جنبه‌های زیســـت‌شـــیمیایی و فیزیولوژی تجزیه زیســـتی فراهم کنند. روش‌های وابســـته به کشـــت و مســـتقل از کشـــت عموماً برای شناسایی جمعیت میکروبی به کار برده می‌شوند.

از آن‌جاکه بیشتر فرایندهای تیمار زیستی به فعالیت‌های جوامع میکروبی پیچیده وابسته است، لذا هنوز هم بایستی در مورد نقش‌های برهم‌کنشی و به هم وابسته‌ی گونه‌ها در این جوامع بیاموزیم (رام، ۲۰۰۵). پویایی جوامع بیشـــتر با روش‌های مســـتقل از کشـــت، یعنی روش‌های مبتنی بر ژن 16S rRNA یا ژن عملکردی، دنبال می‌شـــوند (اســـپایگلمن و همکاران، ۲۰۰۵). تغییرات زمانی و مکانی در جمعیت باکتری‌ها و تنوع جامعه میکروبی در طول فرایندهای تجزیه زیســـتی، می‌تواند با

---

1. *Phanerochaete*
2. *Enterobacter amnigenus*
3. *cloacae*
4. *Oleiphilus*
5. *Oleispira*
6. *Thalassolituus*
7. *Planomicrobium*
8. *Planococcus*

استفاده از روش‌های ترکیبی مولکولی پیچیده، شیمیایی و ابزاری تعیین شود. پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری‌های مولکولی، همراه با اطلاعات ژنومیک به میکروب‌شناس‌ها در حل برخی از نقش‌های متنوع میکروب‌ها در این جوامع و همچنین تعیین اهمیت انتقال افقی ژن در جوامع میکروبی پیچیده کمک زیادی می‌کند. پایش دقیق پویایی جوامع میکروبی می‌تواند سبب کشف الگوهای تجزیه زیستی متداول شود که می‌تواند به توسعه ابزارهای جدید برای ارزیابی سریع فرایندهای زیست‌پالایی در حال انجام کمک کند.

از میان هیدروکربن‌های اشباع، اِن- آلکان‌ها عموماً اجزای قابل تجزیه نفت خام در نظر گرفته می‌شوند (ستی و همکاران، ۱۹۹۳). بر اساس طول زنجیره، اِن- آلکان‌ها به سه گروه تجزیه‌ای آلکان‌های پایین‌تر (C8-C16)، آلکان‌های متوسط (C17-C28)، و آلکان‌های بالاتر، (C28<) تقسیم می‌شوند. گزارش شده است که بسیاری از ریزجانداران رشد کافی روی اِن- آلکان‌ها تا ۱۶ کربن(C16) را داشته و آن‌ها را سریع‌تر تجزیه می‌کنند. تجزیه زیستی اِن- آلکان‌ها با طول زنجیر کربن C8-C16 عموماً با افزایش حلالیت و کاهش کشش سطحی آن‌ها بهتر می‌شود. تجزیه زیستی اِن- آلکان‌ها تا C44 ثابت شده است (ساکا و همکاران، ۱۹۹۴). در بیشتر موارد، افزایش حلالیت در نتیجه ترکیب‌های فعال سطحی تولید شده توسط ریزجانداران تجزیه‌کننده هیدروکربن اتفاق می‌افتاد. امولسیون کردن سوبسترا سطح ویژه آلاینده را افزایش داده و این امر حلالیت را بالا برده و محدودیت‌های انتقال جرم را از بین می‌برد (هِرمان و همکاران، ۱۹۹۷؛ یوست و همکاران، ۲۰۰۰؛ کُما و همکاران، ۲۰۰۱؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۶).

به ساز و کار تجزیه‌ی آلکان‌های شاخه‌دار در مقایسه با اِن- آلکان‌ها کمتر توجه شده است. بیشتر ریزجانداران تجزیه کننده هیدروکربن نمی‌توانند آن‌ها را به طورکامل تجزیه کنند. دگرگونی سیکلوهگزان در محیط خالص یا مخلوط گزارش شده است (دِکلرک و وَن‌دِرلیندن، ۱۹۷۴؛ یوریب و همکاران، ۱۹۹۰). گزارش‌های اولیه از دگرگونی سیکلوهگزان‌ها در محیط‌های خالص و در حضور سوبستراهای همراه نشان داده شده است (اُاُیاما و فوستر، ۱۹۶۵).

تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است (گیبسون و پارالز، ۲۰۰۰؛ گیبسون و هاروود، ۲۰۰۲؛ آندریون و گیان‌فردا، ۲۰۰۷). هیدروکربن‌های آروماتیک سبک اگر محلول باشند در معرض تبخیر و تجزیه میکروبی قرار می‌گیرند. اما وجود استخلاف‌های زیاد متیل در آن‌ها از اکسیداسیون اولیه جلوگیری می‌کند. مقایسه کلی مسیرهای اصلی کاتابولیسم ترکیب‌های آروماتیک در باکتری‌ها نشان داد که مراحل تبدیل اولیه به وسیله آنزیم‌های مختلف انجام می‌شود، اما آن ترکیب‌ها به تعداد محدودی از متابولیت‌های عمومی مانند پروتوکاتکوات[1] و

1. Protocatechuate

کاتکول‌ها[1] دگرگون می‌شـــوند (رینک و ناکموس، ۱۹۸۸؛ کُماندر و پارســـونز، ۱۹۹۰؛ چایودهاری و چاپالامادوگو، ۱۹۹۱). این واسطه‌های کلیدی یکی از دو مسیر شکاف حلقه‌ای را، که یا مسیر شکاف یـک دیول خـارجی[2] (متا) و یا یک مســـیر دیول داخلی[3] (اُرتو) اســـت را تحت تاثیر قرار می‌دهند (هارایاما و همکاران، ۱۹۹۹). در بیشتر موارد، شکافت اُرتوی کاتکول توسط کاتکول ۱،۲ دی‌اکسیژناز و پروتوکاتکوات به وسیله پروتوکاتکوات ۳، ۴ دی‌اکسیژناز نشان داده شده است (فیوسون، ۱۹۹۱).

به طور کلی رزین‌ها و آسـفالتین‌ها مقاوم به تجزیه زیسـتی در نظر گرفته می‌شوند و مسیرهای متابولیکی برای تجزیه این بخش‌ها کمتر شـناسـایی شـده‌اند (وَن‌هام و همکاران، ۲۰۰۳). گونه‌های باکتریایی قادر به اســـتفاده از رزین‌ها به عنوان تنها منبع کربن و انرژی نیز جداســـازی شـــده‌اند (وِن‌کـاتزواران و همکـاران، ۱۹۹۵). این گونـه‌هـای جـدا شـــده از جمعیت‌های مخلوط، در ۵ گروه فنوتیپی: *سـودوموناس*، *ویبریوناسـه*[4]، *انتروباکتریاسـه*[5]، *موراکسـلا*[6] وگونه‌های میله‌ای شبه *نایسریا*[7] دسـته‌بندی می‌شـوند. در میان آن‌ها، یک گونه *سودوموناس*، هنگامی‌که روی رزین‌ها به عنوان تنها منبع کربن رشـد کرد، سازگاری قابل‌توجهی را نسبت به این کلاس‌های با وزن مولکولی بالا از نفت خام نشـان داد. ریزجاندارانی که رزین‌ها و آسـفالتین‌ها را به وسـیله کومتابولیسـم تجزیه می‌کنند شـناسـایی شـده‌اند (ریموند و همکاران، ۱۹۷۵). جمعیت‌های مختلط از ریزجانداران دریایی شـامل *ســـودوموناس*، *بروی‌باکتریوم*[8]، *آلکالیجنز*، *آرتروباکتر* و *باســـیلوس* برای کومتابولیزه کردن رزین‌ها و آسـفالتین‌ها شـناسـایی شـده‌اند. حضور هیدروکربن‌های اشباع (C12-C8) به نظر پیش‌نیاز تجزیه رزین‌هـا و آســـفالتین هســـتند. اِن- آلکان‌ها احتمالاً به عنوان منبع کربن و انرژی برای باکتری‌ها اســـتفاده می‌شـــوند، و یا ممکن اســـت با فرآورده‌های تجزیه‌ای اســـید چرب‌شـــان در حل کردن و امولسـیون کردن رزین‌ها و آسـفالتین‌ها مفید باشـند. پژوهش‌های شـناسایی رزین‌های نفت خام به وسـیله طیف‌سنجی FTIR نشان داده که رزین‌ها در مقایسه با آسفالتین‌ها، ویژگی آلیفاتیک بیشتر و آروماتیک کمتر داشته و بیشتر اکسید می‌شوند (بوکیر و همکاران، ۲۰۰۱).

---

1. Catechols
2. Extra-diol
3. Intra-diol
4. *Vibrionaceae*
5. *Enterobacteriaceae*
6. *Moraxella*
7. *Neisseria*
8. *Brevibacterium*

۹-۴- پالایش زیستی

فاضلاب پالایشگاه نفت خام دارای نفت شناور و ذرات معلق است که می‌توان آن را به روش فیزیکی جداسازی و بازیافت کرد. اما بخشی از این نفت با ذرات آلی و معدنی همراه شده و لجن‌هایی را تشکیل می‌دهند که نیاز به دفع مناسب به عنوان ضایعات جامد را دارد. لجن‌های نفتی حاصل از جداسازی در تاسیسات تصفیه پساب و کف مخازن، جایی‌که رسوبات در مخازن ذخیره جمع می‌شوند، از نظر اقتصادی نمی‌توانند بازیافت شوند. بیشتر این مواد به عنوان ضایعات خطرناک طبقه‌بندی می‌شوند و بنابراین دفن این لجن‌ها به شدت بر اساس مقررات است و بر آن نظارت می‌شود. فن‌آوری زیست‌پالایی به عنوان یک روش موثر و اقتصادی مناسب برای پاک‌سازی خاک‌ها و لجن‌های آلوده به هیدروکربن، یا به شکل در محل یا خارج از محل بعد از حفاری یا انتقال، مطرح شده است. در مواردی که خاک‌ها یا به به دلایل قانونی یا نبود دسترسی به زمین کافی، یا به سبب خطرات آلودگی آب‌های زیرزمینی و هوا، نمی‌توانند در محل پالایش شوند، بایستی حفاری شده و با استفاده از واحدهای زمین‌پالایی، روش‌های کمپوست کردن یا استفاده از دپوکردن زیستی یا فن‌آوری‌های راکتورهای زیستی دوغابی، زیست‌پالایی شوند.

زیست‌پالایی مکان‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در کشورهای در حال توسعه معمولاً شامل فرایندهای زمین‌پالایی است که در آن به خاک آلوده، مواد غذایی افزوده می‌شود و به صورت دوره‌ای شخم زده شده و آبیاری می‌شود تا جمعیت میکروبی بومی تحریک شده و آلاینده‌ها را در طول یک بازه زمانی درازمدت که معمولاً بین ۶ تا ۲۴ ماه است، تجزیه کنند. در واحدهای زمین‌پالایی می‌توان یک سیستم جمع‌آوری شیرابه طراحی کرد که از مهاجرت هیدروکربن‌های محلول در آب به خارج از محل جلوگیری کند. اگر چنانچه سیستم پالایشی به گونه‌ای طراحی شده باشد که انتقال آلاینده‌ها به دیگر بخش‌های محیطی به حداقل برسد و یا از آن ممانعت شود، زمین‌پالایی یک روش مقرون به صرفه برای پالایش فرآورده‌های نفتی تجزیه‌پذیر زیستی در خاک خواهد بود. یکی از معایب زمین‌پالایی دشواری کاهش دادن غلظت هیدروکربن به بیش از ۸۵-۸۰ درصد مقدار اولیه بوده که ممکن است برای رسیدن به سطوح استاندارهای قانونی در برخی از کشورها مناسب نباشد. زمین‌پالایی برای پالایش آلاینده‌هایی که فرار بوده یا به آسانی تجزیه زیستی می‌شوند با موفقیت نسبی استفاده شده است. با این‌حال، این فن‌آوری نمی‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی برای پالایش هیدروکربن‌های مقاوم مانند هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا استفاده شود. همچنین، شواهدی وجود دارد که مقدار قابل توجهی از هیدروکربن‌ها به جای تجزیه زیستی، تبخیر می‌شوند (رمزی و حسین، ۲۰۰۴).

در کمپوست کردن خاک آلوده با مواد آلی مانند کاه و کلش، تراشه‌های چوب، و لجن فاضلاب برای بهبود هوادهی مخلوط می‌شود و مخلوط برای حمایت از رشد ریزجانداران تجزیه‌کننده هیدروکربن به شکل پشته‌ها یا ردیف‌هایی که هوادهی شوند قرار می‌گیرد. به سیستم کمپوست کردن مهندسی شده، دپوکردن زیستی گفته می‌شود که در آن هوادهی از طریق شبکه‌ای از لوله‌های منفذدار ایجاد شده و از یک سیستم جمع‌آوری شیرابه هم برای هیدروکربن‌های محلول در آب استفاده می‌شود (وُن‌فانستوک و همکاران، ۱۹۹۸). طولانی شدن زمان پالایش در روش‌های زمین‌پالایی یا کمپوست کردن معمولاً به سبب کنترل نکردن عوامل موثر بر فعالیت میکروبی، مانند رطوبت، اکسیژن، دما، pH و مخلوط کردن است. رآکتورهای زیستی که برای تجزیه سریع‌تر هیدروکربن طراحی شده‌اند، کنترل بیشتر عوامل عملیاتی را فراهم می‌کنند (وُن‌فانستوک و همکاران، ۲۰۰۳). هوادهی پیوسته و هم‌زدن، واجذب هیدروکربن‌ها از خاک به فاز مایع را آسان می‌کند و اکسیژن کافی برای میکروب‌ها به منظور افزایش سرعت زیست‌پالایی فراهم می‌شود. در رآکتورهای زیستی محصور، پارامترهای عملیاتی بهینه مانند pH، دما، اکسیژن، رطوبت، هم‌زدن و فراهمی زیستی مواد غذایی، رشد میکروبی مطلوب و فعالیت تجزیه هیدروکربن را بالا می‌برد (وارد و همکاران، ۲۰۰۳).

روش‌های گیاه‌پالایی شامل برخی گیاهان ویژه و ریزجانداران رایزوسفری آن‌ها است که هم با ایجاد شرایط مطلوب برای تجزیه آلودگی توسط میکروب‌های ساکن در ریشه گیاه، و هم با دسترسی به آلاینده‌ها از طریق ریشه‌های گیاه ، سبب پالایش آلودگی می‌شوند (مُنِت‌سینوز، ۲۰۰۳؛ کرامر، ۲۰۰۵؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۸). زیست توده در حال تجزیه و ترشحات ریشه گیاه مواد غذایی را فراهم کرده و دگرگونی‌های کومتابولیکی برخی از آلاینده‌های آلی را تحریک می‌کند. روش‌های گیاه‌پالایی خاک شامل:

- گیاه‌تثبیتی. گیاهان مناسب برای گیاه‌تثبیتی بایستی قادر به توسعه یک سیستم ریشه‌ای گسترده باشند، پوشش مناسبی برای خاک به منظور جلوگیری از فرسایش آبی و بادی فراهم کنند، در برابر آلاینده‌های فلزی مقاوم باشند و آلاینده‌ها را در رایزوسفر ناپویا کنند.
- گیاه‌تصعیدی. در این فرایند، آلاینده پس از جذب توسط گیاه، به درون اتمسفر به شکل اصلی آن یا شکل اصلاح شده بعد از جذب آن تبخیر می‌شود. این روش برای کاربردهای تجاری مناسب تشخیص داده نشده است.
- تحریک گیاهی[1]. در این فرایند ترشحات ریشه گیاه منجر به تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های رایزوسفری برای تجزیه آلاینده می‌شوند.

1. Phytostimulation

- تغییر و تبدیل گیاهی[1]. در این فرایند، آلاینده‌ها معمولاً به گونه‌های با سمیت کمتر در درون گیاه تغییر شکل می‌یابند.
- استخراج گیاهی (گیاه‌جذبی). در این فرایند گیاهان مناسب، آلاینده‌های خاک را در اندام‌های هوایی خود انباشت می‌کنند. سپس زیست توده گیاهی برداشت شده، خشک یا خاکستر می‌شود، سپس خاکستر سرشار از آلودگی یا در زمین دفن می‌شود یا برای سوزاندن به کوره فرستاده می‌شود.

۹-۵- اصلاح‌کننده‌های تغذیه‌ای و میکروبی

پیامد محیط کشت‌های میکروبی و اصلاح‌کننده‌های آلی و معدنی بر تجزیه چندین آلاینده‌ی گوناگون خاک در محیط‌های سطحی و زیرسطحی مورد بررسی قرار گرفته است (اسمیندال و همکاران، ۱۹۸۸؛ چو و همکاران، ۱۹۹۷؛ یوحَز، ۲۰۰۵؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۶). عوامل غیرزیستی مانند بافت خاک، pH، دما، مقدار رطوبت، مقدار ماده آلی و قابلیت دسترسی به سوبسترا بایستی با دقت به عنوان بخشی از راهبرد تقویت میکروبی یا تغذیه‌ای در فرایندهای زیست‌پالایی مورد توجه قرار گیرند (تامسون و همکاران، ۲۰۰۵). مشخص شده که افزودن اصلاح‌کننده‌هایی مانند نارگیل، زغال چوب، سلولز، کاه، پوسته سویا، بخش اسید هیومیک خاک کمپوست شده، خاک اره، خاکستر چوب، یولاف، ترشحات و بقایای ریشه به خاک، فرایند زیست‌پالایی را افزایش می‌دهند (پُمِتو و همکاران، ۱۹۹۸؛ میشرا و همکاران، a, b ۲۰۰۱؛ میا و فایرستون، ۲۰۰۱؛ اُدُسن و همکاران، ۲۰۰۱).

ازفرآورده‌های تجاری میکروبی نیز برای تجزیه نفت خام استفاده می‌شود. وِکیولی و همکاران (۱۹۹۰) بیان کردند که خاک اصلاح شده با تجزیه‌کننده‌های تجاری هیدروکربن‌ها سریع‌تر از خاک شاهد که برای تجزیه تنها کود به آن داده شده بود ، آلودگی‌زدایی شد. مایه تلقیح‌های طبیعی چه سازگار و چه ناسازگار باشند، در کاهش دوره زمانی زیست‌پالایی از همه موثرتر بودند. با این حال، در یک مطالعه میدانی که در دلاور[2] انجام شد و در آن خط ساحلی عمداً آلوده شده بود، با مقایسه کارایی زیست‌پالایی با کاربرد کودها (مواد غذایی) و/ یا مایه تلقیح میکروبی نشان داده شد که مایه‌زنی میکروبی در مقایسه با کوددهی سبب افزایش چشم‌گیر زیست‌پالایی نمی‌شود (ونُزا و همکاران، ۱۹۹۶).

---

1. Phytotransformation
2. Delaware

زیســـت‌پـالایی یک خاک آلوده به لجن نفتی در حضـــور مجموعه‌ای از باکتری‌ها، مواد غذایی معدنی، کمپوسـت و عامل سـبک کننده (سـبوس گندم) سبب تجزیه نفت در حدود ۸۰-۶۰ درصد شد (واسودِوِن و راجرم، ۲۰۰۱). افزودن بقایای بستر مرغداری، فیبر نارگیل و سورفکتنت رامنولیپید بـا یـک مجموعـه‌ی باکتریایی در زیســـت‌پالایی یک خاک آلوده به بنزین، تجزیه هیدروکربن را در حدود ۷۸-۶۷ درصـد افزایش داد (رحمان و همکاران، ۲۰۰۲). افزودن سوخت زیستی[1] (متیل استر روغن کلزا) به طور چشم‌گیری تحرک را بهبود داده و در یک پژوهش، سرعت تجزیه نفت خام را در ستون شنی مصنوعی افزایش داد (میلر و ماج، ۱۹۹۷).

کاربرد سـوبسـتراهای آلی مانند اسـتات، پروپیونات، بوتیرات، بنزوات، گلوکز، لاکتات، متانول و تولوئن که برای تیمار حلال‌های کلردار به کار گرفته شـده بود، زیســت‌پالایی بی‌هوازی در محل را افزایش داد (الیس و همکاران، ۲۰۰۰). سوبستراهای پیچیده‌ی ارزان قیمت، مانند ملاس، آب پنیر، نوشـــابـه تند ذرت[2]، روغن‌های گیاهی، روغن ســـرخ کردنی غذا[3] و پیه گاو نیز می‌توانند کلرزدایی کـاهشـــی را تقویـت کننـد (هی و همکـاران، ۲۰۰۲). انتظـار می‌رود کـه هر ماده آلی که بتواند به هیدروژن و اسـتات تخمیر شـود کلرزدایی کاهشـی را تحریک می‌کند (سـانگ و همکاران، ۲۰۰۳). مشـخص شـده که انواع گوناگونی از سـوبستراهای آلی با پایه غذایی مانند روغن گیاهی و استرهای اسیدهای چرب ساکاروز، از فرایندهای زیست‌پالایی طولانی مدت بی‌هوازی (محیط‌های) زیرسطحی حمایت می‌کنند (بُردن و رودریگز، ۲۰۰۶).

روش‌های موثر برای گزینش، آماده‌ســـازی و نگه‌داری از ویژگی حیاتی ریزجانداران تجزیه‌کننده نفـت برای تقویت زیســـتی میدانی مورد نیاز هســـتند (لادوس و ترامیر، ۱۹۹۱؛ باربیو و همکاران، ۱۹۹۷). با اســـتفاده از روش‌های تخمیری که در آن از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی اســـتفاده می‌شـــود، می‌توان ماده تلقیحی برای پژوهش‌های زیســـت‌پالایی تهیه کرد. در تهیه ماده تلقیحی بایســـتی به کوتاه شـــدن چرخه‌ی زندگی باکتری در مقیاس وســـیع تولید، دارا بودن مزیت رقابتی آن، و صـرفه‌جویی در هزینه توجه کرد. مجموعه‌های میکروبی غنی شـده برای پالایش خاک لومی آلوده به گازوئیل مفید تشـخیص داده شـده‌اند (روبین و نارکیس، ۲۰۰۱). در پژوهشی که در خاک آلوده در مقیاس وسـیع انجام شـد، تشدید زیستی یک ماده تلقیحی متشکل از مجموعه‌ای از ریزجانداران که با مواد غذایی غنی‌شـده بود، تجزیه‌ی TPH را به ۹۲-۸۹ درصـد رسـاند (میشـرا و همکاران، ۲۰۰۱a). در پژوهشی دیگر، توسط همان نویسندگان، یک حامل دارای مجموعه باکتریایی برای زیسـت‌پالایی در محل به کار برده شد. همچنین امکان کاربرد حامل دارای مجموعه باکتریایی

1. Biodiesel
2. Corn steep liquor
3. Food shortening

در مقیاس وسیع برای پالایش خاک آلوده به لجن نفتی مورد تایید قرار گرفت (میشرا و همکاران، ۲۰۰۱b).

مایه‌زنی میکروبی خاک‌های آلوده به نفت نیاز به این دارد که ماده تلقیحی پیش از انتقال به زمین تولید شود. هنگامی‌که مواد تلقیحی به خاک افزوده می‌شوند، چون نیاز گزینش‌پذیری زیست‌بوم برای حفظ تعداد مورد نیاز یاخته در محیط جدید رعایت نمی‌شود، بنابراین، فرمولاسیون‌های مختلف ماده تلقیحی که در آن مواد حامل وجود دارد، گزینه بهتری هستند. طیف گسترده‌ای از حامل‌ها که از ترکیب‌های طبیعی و یا گیاهی به دست آمده‌اند، آزمایش و به کار گرفته شده‌اند. به طور کلی مواد حامل برای ایجاد محیط حفاظتی برای ریزجاندار هستند (وَن‌السساس و هاینن، ۱۹۹۰). باکتری‌های ناپویا شده روی آلژینات یا پلی‌یورتان نیز برای تجزیه PCP در خاک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (اُریلی و کراوفورد، ۱۹۸۹؛ ویر و همکاران، ۱۹۹۶). یاخته‌های میکروبی کپسول شده[1] برای کاربرد در سفره‌های آب زیرزمینی آلوده استفاده شده‌اند (استورمو و کراوفورد، ۱۹۹۲؛ منوهر و کِرگودار، ۱۹۹۸).

۹-۶- عوامل اثرگذار بر زیست‌پالایی هیدروکربن

طیفی از عوامل زیست محیطی که فیزیکی، شیمیایی یا زیستی هستند در زیست‌پالایی آلاینده‌های نفتی اثر گذارند. هوادیدگی، جذب، تبخیر و تصعید، آبشویی و فرایندهای اکسایش نوری ممکن است سبب حذف ترکیب‌های هیدروکربنی در طول زیست‌پالایی شود، که سبب بیش‌برآورد مقدار تخریب زیستی می‌شود. در حدود ۶۰-۱۵ درصد از هیدروکربن‌های سوختی، شامل PAH های چهار و پنج حلقه‌ای نیمه فرار، می‌توانند تنها به سبب تصعید در طول زیست‌پالایی خاک از بین بروند (هیوسمن، ۱۹۹۵؛ هاوتورن و گرابانسکی، ۲۰۰۰؛ سالانیترو، ۲۰۰۱؛ مِفکگو و همکاران، ۲۰۰۴). بار لجن با غلظت نفت بالا ممکن است فعالیت تجزیه زیستی را به سبب محدودیت اکسیژن و یا سطوح مهار کننده هیدروکربن‌ها برای ریزجانداران کاهش دهد. از آن‌جا که مقادیر بار لجن ۱۵-۱۰ درصدی به طور چشم‌گیری سرعت تجزیه زیستی را کاهش می‌دهد، لذا بار لجن در حدود ۵ درصد نفت توصیه شده است (دیبل و بارتا، ۱۹۷۹).

تجزیه زیستی هیدروکربن می‌تواند در طیف وسیعی از pH و دما رخ دهد. pH بهینه برای زیست‌پالایی نفت خام در خاک در محدوده ۶ تا ۸ است. اگر pH خاک در محدوده اسیدی باشد (pH <۶) معمولاً، آهک به خاک افزوده شده و اگر خاک بسیار قلیایی باشد (pH>۸)، گوگرد عنصری یا سولفات آمونیوم برای پایین آوردن pH به خاک اضافه می‌شود. به طور کلی سرعت

1. Encapsulated microbial cells

تجزیه زیستی از دماهای کم به متوسط افزایش می‌یابد. دمای بهینه برای تجزیه زیستی در محدوده ۴۰- ۲۵ درجه سلسیوس گزارش شده است (وَن‌هام و همکاران، ۲۰۰۳). دما با تاثیر بر شرایط فیزیکی و ترکیب شیمیایی نفت و همچنین فعالیت‌های متابولیکی و ترکیب جامعه میکروبی بر تجزیه زیستی هیدروکربن اثر گذار است (کراوفورد و زو، ۱۹۹۵؛ وال‌ورس و رینولدز، ۱۹۹۵). گزارش شده که گونه‌های *باسیلوس* قادر به رشد روی هیدروکربن‌های نفتی در محدود ۷۰ -۴۰ درجه سلسیوس هستند (مارکُوتز، ۱۹۷۱؛ سُرخو و همکاران، ۱۹۹۳). مشخص شده که سویه Q15 *رودوکوکوس* سرمادوست آلکان‌های کوتاه زنجیره را به مقدار بیشتری از آلکان‌های بلند زنجیره در دماهای پایین‌تر از صفر و ۵ درجه سلسیوس معدنی می‌کند (ویت و همکاران، ۲۰۰۲). دماهای پایین سرعت تصعید هیدروکربن‌های با وزن مولکولی پایین را نیز کاهش می‌دهند. پژوهش‌ها روی بررسی امکان کاربرد زیست‌پالایی به عنوان یک گزینه پالایشی در یک دوره زمانی برای یک خاک آلوده به نفت-گازوئیل در یک منطقه یخچالی در آلپ در ارتفاع ۲۸۷۵ متر بالاتر از سطح دریا برای سه فصل تابستان مشخص کرد که در دمای متوسط (۴۰ -۲۰ درجه سلسیوس) هم تلفات غیرزیستی بیشتر شده و هم مقادیر متابولیسم هیدروکربن بالاتر می‌رود (مارجینز و شینر، ۲۰۰۱).

فراهمی مواد غذایی نقش مهمی را در سازگاری میکروب‌ها و رشد آن‌ها روی هیدروکربن‌ها بازی می‌کنند. دو ماده غذایی عمده، نیتروژن و فسفر، مهم‌ترین آن‌ها در نظر گرفته می‌شوند. زیرا آن‌ها برای ورود کربن به زیست توده ضروری هستند. نیتروژن و فسفر اغلب عوامل محدود کننده در تجزیه زیستی هیدروکربن هستند (مانند موردی که در منطقه پرینس ویلیام سوند[1] بعد از نشت از نفت‌کش اکسون والدز[2] مشخص شد) (پریچارد و کوستا، ۱۹۹۱)، و نسبت C:N و/ یا C:P بالا برای رشد میکروبی نامناسب است (تُکلینو و همکاران، ۱۹۹۳). مشخص شد که مقادیر ۱:۶۰ و ۱:۸۰۰ به ترتیب برای نسبت‌های C:N و C:P در زیست‌پالایی لجن نفتی مناسب هستند (دیبل و بارسا، ۱۹۷۹).

اهمیت اکسیژن برای تجزیه هیدروکربن با این واقعیت نمود پیدا می‌کند که مسیرهای اصلی تجزیه هیدروکربن‌های اشباع، حلقوی و آروماتیک در باکتری‌ها و قارچ‌ها برعهده اکسیژنازهایی است که برای کارشان نیاز به اکسیژن مولکولی دارند (سرنیگلیا، ۱۹۸۴؛ اطلس، ۱۹۹۵). برای حفظ فعالیت‌های متابولیکی یاخته‌های میکروبی، مقدار تامین اکسیژن بایستی با مقدار کلی مصرف اکسیژن در شرایط تعادل منطبق باشد (اندرسون و هلدر، ۱۹۸۷؛ هیوسی‌من و تروکس، ۱۹۹۶). انتشار اکسیژن در خاک می‌تواند به شدت در خاک‌های غرقابی یا مرطوب محدود شود. افزودن عوامل حجیم کننده و شخم دوره‌ای می‌توانند تخلخل خاک را افزایش دهند و سرعت مصرف

1. Prince William Sound
2. Exxon Valdez

اکسیژن در متابولیسم باکتریایی را بهبود بخشند (دِوینی و ایسلندر، ۱۹۸۹). تهویه مناسب توسط شبکه‌ای از لوله‌های منفذدار در دپوکردن زیستی، و اختلاط بهینه و هوادهی در رآکتورهای زیستی دوغابی تامین می‌شود (وارد و همکاران، ۲۰۰۳).

تجزیه بی‌هوازی هیدروکربن‌های نفتی نیز گزارش شده است، اما مشخص شده که سرعت تجزیه سیستم زیست‌پالایی در عمل بسیار کند است (وارد و بروک، ۱۹۷۸). ثابت شده است که باکتری‌های کاهنده سولفات می‌توانند در شرایط بدون اکسیژن/ بی‌هوازی مستقیماً از هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک استفاده کنند (سو و یانگ، ۱۹۹۹). بُلیجر و همکاران (۱۹۹۹) نشان داده‌اند که معدنی شدن هیدروکربن نفتی در آب‌خوان‌های بی‌هوازی به مصرف اکسید کننده‌هایی مانند O_2، NO_3^- یا سایرین، و تولید متعاقب گونه‌های کاهش‌یافته نظیر مرتبط بود. ریزجانداران دنیتریفیکاتور[1] نیز تجزیه آلکان و آلکیل بنزن‌ها را در شرایط بی‌هوازی انجام می‌دهند (اِرین‌ریچ و همکاران، ۲۰۰۰؛ رابوس و همکاران، ۱۹۹۹).

کاهش زیست فراهمی هیدروکربن‌ها می‌تواند تجزیه زیستی را به ویژه در خاک‌های تکامل یافته که سالیان پیش آلوده شده‌اند و در مراحل پایانی فرایندهای تیمار زیست‌پالایی هستند، محدود کند (الکساندر، ۲۰۰۰). انتقال جرم هیدروکربن‌ها به درون یاخته‌های میکروبی یک عامل تعیین کننده قابل‌توجه از شدت و وسعت تجزیه زیستی است. زیست فراهمی هیدروکربن و تجزیه پس از آن می‌تواند به وسیله افزودن سورفکتنت‌های شیمیایی و زیستی بهبود یابد. البته بسته به فیزیولوژی میکروب‌های درگیر، انتقال جرم ممکن است به شکل مثبت یا منفی، تاثیر پذیرد، یا در حضور یک سورفکتنت (زیستی) هرگز تحت تاثیر قرار نگیرد (داس و موکرجی، ۲۰۰۷). در پژوهشی جدید، مشخص شد که یک سورفکتنت زیستی، واجذب PAH های چهار حلقه‌ای از خاک را به شدت افزایش داده و سبب افزایش تجزیه زیستی آن توسط سویه PA-10 *سودوموناس آلکالیجنز* شد. دلیل این امر احتمالاً ترکیبی از حلالیت و افزایش زیست توده بوده است. زیرا سورفکتنت زیستی می‌تواند به عنوان منبع کربن نیز مورد استفاده قرار گیرد (هیکی و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین ریزجاندارانی که سورفکتنت‌های زیستی را بیش از حد تولید می‌کنند، ممکن است نقش مهمی در فرایند تجزیه هیدروکربن داشته باشند.

1. Denitrifying

۹-۷- نتیجه‌گیری

زیست‌پالایی موفق خاک به عوامل متعدد زیست‌محیطی، تغذیه‌ای و عملیاتی وابسته است. از آن‌جا که بعید است که تمامی آلاینده‌ها از یک خاک آلوده، حتی در شرایط بهینه، حذف شوند، کارایی فرایند زیستی به موفقیت در شناسایی عوامل محدود کننده سرعت و بهینه‌سازی آن‌ها به منظور رسیدن به بیشینه میزان پالایش وابسته است. سیستم‌های مهندسی یا طراحی شده نامناسب احتمالاً برای رسیدن به ضوابط قانونی محلی پالایش شکست می‌خورند. دانش ما در رابطه با تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در دو دهه گذشته پیشرفت کرده است. تعدادی از سویه‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن با استفاده از روش‌های مولکولی پیشرفته جداسازی و شناسایی شده‌اند. افزایش درک ما از زیست‌بوم جوامع میکروبی تجزیه‌کننده هیدروکربن و ساز وکارهایی که تجزیه زیستی را انجام می‌دهند در توسعه راهبردهای کاربردی زیست‌پالایی خاک کمک خواهد کرد.

منابع

Alexander M (2000) Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environ Sci Technol 34:4259–4265.

Anderson FO, Helder H (1987) Comparison of oxygen micro-gradients, oxygen flux rates and electron transport system activity in coastal marine sediments. Mar Ecol Prog Ser 37:259–264.

Andreoni V, Gianfreda L (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. Appl Microbiol Biotechnol 76:287–308.

Atlas RM (1995) Petroleum biodegradation and oil-spill bioremediation. Mar Poll Bull 31:178–182.

Barbeau C, Deschenes L, Karamanev D, Comeau Y, Samson R (1997) Bioremediation of Pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. Appl Microbiol Biotechnol 48:745–752.

Bartha R, Bossert I (1984). The fate of petroleum in the soil ecosystems. In: Atlas RM (ed) Petroleum microbiology. Macmillan, New York, pp 435–473.

Bolliger C, Hohener P, Hekeler D, Haberli K, Zeyer J (1999) Intrinsic bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and assessment of mineralization based on stable carbon isotopes. Biodegradation 10:201–217.

Borden RC, Rodriguez BX (2006) Evaluation of slow release substrates for anaerobic bioremediation. Biorem J 10:59–69

Boukir A, Aries E, Guiliano M, Asia L, Doumenq P, Mille G (2001) Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. Chemosphere 43:279–286

Brar SK, Verma M, Surampalli RY, Misra K, Tyagi RD, Meunier N, Blais JF (2006) Bioremediation of hazardous waste — a review. Pract Period Hazard Toxic Radioact Waste Manage 10:59–72

Cerniglia CE (1984) Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas RM (ed) Petroleum microbiology. Macmillan, New York, pp 99–128

Chaudhary GR, Chapalamadgu S (1991) Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol Rev 55:59–79

Cho B-H, Chino H, Tsuji H, Kunito T, Nagaoka K, Otsuka S, Yamashita K, Matsumoto S, Oyaizu H (1997) Laboratory-scale

bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. Chemosphere 35:1599–1611.

Commandeur LCM, Parsons JR (1990) Degradation of halogenated aromatic compounds. Biodegradation 1:207–220.

Crawford RL, Zhou RE (1995) Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. Biodegradation 6:127–140.

Das K, Mukherjee AK (2007) Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. J Appl Microbiol 102:195–203.

de Carcer DA (2007) The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. ISME J 1:215–223.

de Klerk H, van der Linden AC (1974) Bacterial degradation of cyclohexane. Participation of a cooxidation reaction. Anton van Leeuwen 40:7–15.

de Lorenzo V (2006) Blue-print of an oil-eating bacterium. Nat Biotech 24:952–953.

Devinny JS, Islander RL (1989) Oxygen limitations in land treatment of concentrated wastes. Hazard Waste Hazard Mat 6:421–433

Dibble JT, Bartha R (1979) The effect of environmental parameters on the biodegradation of oily sludge. Appl Environ Microbiol 37:729–739.

Ehrenreich P, Behrends A, Harder J, Widdel F (2000) Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria.Arch Microbiol.173:58–64.

Ellis DE, Lutz EJ, Odom JM, Buchanan RJ, Bartlett CL, Lee MD, Harkness MR, Deweerd KA (2000) Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. Environ Sci Technol 34:2254–2260.

Fewson CA (1991) Metabolism of aromatic components by Acinetobacter. In: Towner KJ, Bergogne-Berezin E, Fewson CA (eds) The biology of Acinetobacter. Elsevier, Amsterdam, pp 351–390.

Forsyth JV, Tsao YM, Bleam RD (1995) Bioremediation: when is bioaugmentation needed? In: Hinchee RE, Fredrickson J, Alleman

BC (ed) Bioaugmentation for site remediation. Battelle Press, Columbus, pp 1–14.

Gibson J, Harwood C (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. Annu Rev Microbiol 56:345–369.

Gibson TG, Parales ER (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr Opin Biotechnol 11:236–243.

Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. J Mol Microbiol Biotechnol 1:63–70.

Hawthorne SB, Grabanski CB (2000) Vaporization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sediments at ambient conditions. Environ Sci Technol 34:4348–4353.

He JZ, Sung Y, Dollhopf ME, Fathepure BZ, Tiedje JM, Loffler FE (2002) Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. Environ Sci Technol 36: 3945–3952.

Head IM, Jones DM, Röling FM (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Rev Microbiol 4: 173–182.

Herman DC, Zhang Y Miller RM (1997) Rhamnolipid (Biosurfactant) effect on cell aggregation and biodegradation of residue hexadecane under saturated flow conditions. Appl Environ Microbiol 63: 3622–3627.

Hickey AM, Gordon L, Dobson ADW, Kelly CT, Doyle EM (2007) Effect of surfactants on fluoranthene degradation by Pseudomonas alcaligenes PA-10. Appl Microbiol Biotechnol 74:851–856.

Huesemann MH (1995) Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. Environ Sci Technol 29:7–18.

Huesemann MH, Truex MJ (1996) The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils. J Hazard Mat 51:93–113.

Husain S (2008) Microbial metabolism of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. Remediation 18:131–161.

Iturbe R, Flores C, Torres LG (2007) Operation of a 27-m3 biopile for the treatment of petroleumcontaminated soil. Remediation 18:97–108

Juhasz AL, Waller N, Lease C, Bentham R, Stewart R (2005) Pilot scale bioremediation of creosotecontaminated soil efficacy of enhanced

natural attenuation and bioaugmentation strategies. Biorem J 9:141–157.

Klug MJ, MarkCovetz AJ (1971) Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. Adv Microbiol Physiol 5:1–43.

Koma D, Hasumi F, Yamamoto E, Ohta T, Chung SY, Kubo M (2001) Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by Acinetobacter sp. J Biosci Bioeng 91:94–96.

Krämer U (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. Curr Opin Biotechnol 16:133–141.

Ladousse A, Tramier B (1991) Results of twelve years of research in spilled oil bioremediation Inipol EAP22. In: Proceedings of the 1991 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington, DC, pp 577–581.

Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev 54:305–315.

Macek T, Kotrba P, Svatos A, Novakova M, Demnerova K, Mackova M (2008) Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. Trends Biotechnol 26:146–152.

Manohar S, Karegoudar TB (1998) Degradation of naphthalene by cells of Pseudomonas sp. Strain NGJK1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. Appl Microbiol Biotechnol 49:785–792.

Margesin R, Schinner F (2001) Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of dieseloil- contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Appl Environ Microbiol 67:3127–3183.

Miller NJ, Mudge SM (1997) The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. Spill Sci Technol Bull 4:17–33.

Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B (2001a) Evaluation of Inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge contaminated soil. Appl Environ Microbiol 67:1675–1681.

Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B (2001b) In situ bioremediation potential of an oily sludge degrading bacterial consortium. Curr Microbiol 43:328–335.

Miya RK, Firestone MK (2001) Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender root exudates and root debris. J Environ Qual 30:1911–1918.

Monetsinos E (2003) Plan-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. Int Microbiol 6:221–233.

Mphekgo P, Maila MP, Cloete TE (2004) Bioremediation of petroleum hydrocarbons through land farming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? Rev Environ Bio/Technol 3:349–360.

Ooyama J, Foster JW (1965) Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons. Anton van Leeuwen 31:45–65.

O'Reilly KT, Crawford RL (1989) Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized Flavobacterium cells. Appl Environ Microbiol 55:2113–2118.

Paul D, Pandey G, Pandey J, Jain RK (2005) Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. Trends Biotechnol 23:135–142.

Pometto AI, Oulman CS, Dispirito AA, Johnson KE, Baranow S (1998) Potential of agricultural by-products in the bioremediation of fuel spills. J Ind Microbiol Biotechnol 20:369–372.

Pritchard PH, Costa CF (1991) EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ Sci Technol 25:372–379.

Rabus R, Wilkes H, Schramm A, Harms G, Behrends A, Amann R, Widdel F (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of proteobacteria. Environ Microbiol 1:145–157.

Rahman KS, Banat IM, Thahira J, Thayumanavan T, Lakshmanaperumalsamy P (2002) Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith, and rhamnolipid biosurfactant. Bioresour Technol 81:25–32.

Ram RJ (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. Science 308:1915–1920.

Ramzi RF, Husain T (2004) Landfarm performance under arid conditions. 1. Conceptual framework. Environ Sci Technol 38:2449–2456.

Raymond RL, Hudson JO, Jamison VW (1975) Oil degradation in soil. Appl Environ Microbiol 31:522–535.

Reineke W, Knackmuss HJ (1988) Microbial degradation of haloaromatics. Annu Rev Microbiol 42:263–287.

Rubin H, Narkis N (2001) Feasibility of on-site bioremediation of loam soil contaminated by diesel oil. J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst 36:1549–1558.

Sakai Y, Maeng JH, Tani Y, Kato N (1994) Use of long-chain n-alkanes (C13-C44) by an isolate Acinetobacter sp. M-1. Biosci Biotechnol Biochem 58:21282130.

Salanitro JP (2001) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. Adv Agron 72:53–105.

Scullion J (2006) Remediating polluted soils. Naturwissenschaften 93:51–56.

Setti L, Lanzarini G, Pifleri PG, Spagna G (1993) Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a Pseudomonas sp. Chemosphere 2:1151–1157.

Smindoll CM, Aelion CM, Pfaender FK (1988) Influence of inorganic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. Appl Environ Microbiol 54:212–217.

So CM, Young LY (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. Appl Environ Microbiol 65:2969–2976.

Song HG, Peterson TA, Bartha R (1986) Hydrocarbon mineralization in soil: relative bacterial and fungal contribution. Soil Biol Biochem 18:109–111.

Song HG, Wang X and Bartha R (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. Appl. Environ. Microbiol. 56:652–656.

Sorkhoh NA, Ibrahim AS, Ghannoum MA, Radwan SS (1993) High temperature hydrocarbon degradation by Bacillus stereothermophilus from oil-polluted Kuwaiti desert. Appl Microbiol Biotechnol 39:123–126.

Spiegelman D, Whissell G, Greer CW (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. Can J Microbiol 51:355–386.

Stormo KE, Crawford RL (1992) Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. Appl Env Microbiol 58:727–730.

Sung Y, Ritalahti KM, Sanford RA, Urbance JW, Flynn SJ, Tiedje JM, Loffler FE (2003) Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as Desulfuromonas michiganensis sp nov. Appl Environ Microbiol 69:2964–2974.

Thompson IP, van der Gast CJ, Ciric L, Singer AC (2005) Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. Environ Microbiol 7:909–915.

Toccalino PL, Jhonson RL, Boone DR (1993) Nitrogen limitation and nitrogen fixation during alkane biodegradation in a sandy soil. Appl Environ Microbiol 59:2997–2983.

Udosen ED, Essien JP, Ubom RM (2001) Bioamendment of a petroleum contaminated ultisol: effect on oil content, heavy metals and pH of tropical soil. J Environ Sci (China) 13:92–98.

Uribe S, Rangel P, Espinola G, Aguirre G (1990) Effects of cyclohexane, an industrial solvent, on the yeast Saccharomyces cerevisiae and an isolated yeast mitochondria. Appl Environ Microbiol 56:2114–2119.

Van Elsas JD, Heijnen CE (1990) Methods for the introduction of bacteria in soil: a review. Bioi Fertil Soils 10:127–133.

Van Hamme J, Singh A, Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 67:503–549.

Vasudevan N, Rajaram P (2001) Bioremediation of oil sludge contaminated soil. Environ Int 26:409–411.

Vecchioli GI, Del Panno MT, Painceira MT (1990) Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. Environ Pollut 67:249–258.

Venkateswaran K, Koaki T, Kato M, Maruyama T (1995) Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. Can J Microbiol 41:418–424.

Venosa AD, Suidan MT, Haines JR, Wrenn BA, Strohmeir KL, Eberhart Looye BL, Kadkhodayan M, Holder E, King D, Anderson B (1996) Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. Environ Sci Technol 30:1764–1775.

Von Fahnestock FM, Wickramanayake GB, Kratzke RJ, Major WR (1998) Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils, Battelle Press, Columbus, OH.

Walworth JL, Reynolds CM (1995) Bioremediation of a petroleum-contaminated cyric soil: effects of phosphorous, nitrogen and temperature. J Soil Cont 4:299–310.

Ward DM, Brock TD (1978) Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. Appl Environ Microbial 35:353–359.

Ward OP, Singh A, Van Hamme JD (2003) Accelerated biodegradation of petroleum waste. J Ind Microbiol Biotechnol 30:260–270.

Weir SC, Providenti MA, Lee H and Trevors, ST (1996). Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by pseudomonas sp UG14Lr in Creosote-contaminated soil. J. Ind. Microbiol. 16:62–67.

Whyte LG, Schultz A, Luz AP, Pellizari V, Labbe D, Greer CW (2002) Prevalance of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. FEMS Microbiol Lett 1373:1–10.

Yuste L, Corbella ME, Turiegano MJ, Karlson U, Puyet A, Rojo F (2000) Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS Microbiol Ecol 32:69–75.

فصل دهم

زیست‌پالایی سفره‌های آب زیرزمینی آلوده به بنزن

Kazuya Watanabe and Yoh Takahata

۱۰-۱- مقدمه

آلودگی آب زیرزمینی با بنزین یک مشکل زیست‌محیطی جدی است زیرا ممکن است منابع آب آشامیدنی را تحت تاثیر قرار دهد. بنزن، تولوئن، و زایلن‌ها (BTX) ترکیب‌های اصلی آلاینده‌های مشتق از بنزین هستند و چون سمی بوده و در آب محلول‌اند، نگرانی زیادی ایجاد کرده‌اند (مهلمن، ۱۹۹۲). از میان آن‌ها، بنزن به دلیل سرطان‌زا بودن اهمیت ویژه‌ای دارد (آژانس مواد سمی و ثبت بیماری‌ها[1] (ATSDR) ۱۹۹۷؛ آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۲). روش‌های پالایش معمول، مانند پمپ کردن و پالایش و پخش هوا، برای پالایش آب زیرزمینی آلوده به غلظت‌های بالای BTX به کار رفته‌اند. با این حال، برگشت به حالت اول و باقی‌مانده آلاینده‌ها، در بسیاری از موارد، در چنین پالایش‌هایی دیده شده و منجر به دوره عملیاتی طولانی‌تر از مدت پیش‌بینی شده است (آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۱۹۹۶).

روش کاهش طبیعی غلظت آلاینده (NA) به عنوان یک گزینه جالب برای پالایش آب‌های زیرزمینی آلوده مورد توجه قرار گرفته است. زیرا تاکید این روش در پاک‌سازی یا کاهش آلودگی بیشتر به فرایندهای طبیعی است تا مصنوعی. در پالایش طبیعی، انواعی از فرایندها شامل جذب، پراکندگی و رقیق‌سازی، واکنش شیمیایی، تصعید، و تجزیه زیستی در پاک‌سازی نقش دارند (آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۱۹۹۹). با این حال پیشنهاد شده است که تجزیه زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد. مشخص شده که بنزن به راحتی در شرایط هوازی دچار تجزیه زیستی می‌شود. با این حال در سفره‌های آب زیرسطحی آلوده شده با بنزین اغلب شرایط بی‌هوازی حاکم است و در آن بنزن بسیار پایدارتر از تولوئن و زایلن‌ها است (اندرسون و لاولی، ۱۹۹۷؛ کریستنسن و همکاران، ۱۹۹۴؛ لاولی، ۱۹۹۷). هر چند پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تجزیه زیستی بنزن در شرایط کاهش نیترات (بِرلاند و اِدواردز، ۱۹۹۹؛ اولریچ و اِدواردز، ۲۰۰۳)، کاهش سولفات (اِدواردز و گربیک-گالیک، ۱۹۹۲؛ لاولی و همکاران، ۱۹۹۵)، کاهش آهن (لاولی و همکاران، ۱۹۹۴)، کاهش پرکلرات (چاکربورتی و همکاران، ۲۰۰۵)، و در شرایط متان‌زایی (گربیک- گالیک و وُگل، ۱۹۸۷؛ کاسای و همکاران، ۲۰۰۵) رخ می‌دهد، اما تجزیه بی‌هوازی بنزن در محل معمولاً بسیار کم است. بنابراین پیشنهاد می‌شود که روش تقویت زیستی ممکن است بیشتر از روش تحریک زیستی در تسریع آن مفید باشد.

در این فصل، ما کارهای خود را که درباره‌ی شناسایی باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن در سفره‌های آب زیرزمینی، جداسازی یک باکتری بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن *آزوارکوس*[2] سویه

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
2. *Azoarcus* sp.

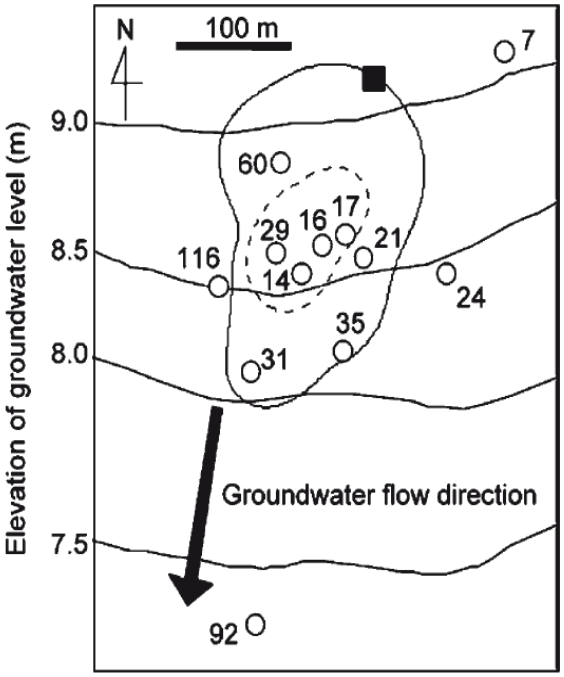
DN11)، و ارزیابی آن برای کاربرد در تقویت زیستی سفره آب زیرزمینی آلوده به بنزن بوده را به طور خلاصه آورده‌ایم. البته تاکنون سویه DN11 به طور عملی در تقویت زیستی به کار گرفته نشده است. ولی داده‌های ما قویاً نشان می‌دهد که این سویه می‌تواند برای آن هدف مفید باشد.

۱۰-۲- آنالیزهای یک سفره آب زیرزمینی آلوده به بنزین

مکان آلوده به BTX که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت در شهر هیگاشی‌نو استان کوماموتو ژاپن بود (شکل ۱۰-۱). ویژگی‌های زمین‌شیمی دقیق این مکان در جایی دیگر گزارش شده است (تاکاهاتا و همکاران، ۲۰۰۶). در ژانویه ۱۹۹۱، مشخص شد که آب زیرزمینی در این مکان آلوده به بنزین است. آلودگی از یک مخزن ذخیره سوخت زیرزمینیِ یک پمپ بنزین نشت کرده بود. در ابتدا مخزن زیرزمینی و خاک شدیداً آلوده‌ی پیرامون آن حفاری و برداشته شدند. سپس سفره آب آلوده پایین دست آن، به وسیله سامانه پمپاژ و هوادهی نصب شده در مرکز منطقه آلوده از فوریه ۱۹۹۲ پالایش شد. این سامانه تا اندازه‌ی چشم‌گیری غلظت‌های آلاینده را کاهش داد، اما غلظت‌های پایین آلودگی پایدار بودند (تاکاهاتا و همکاران، ۲۰۰۶). مشکل این بود که حتی پس از ده سال پالایش، غلظت بنزن در آب زیرزمینی برخی از چاه‌ها که در مرکز منطقه آلودگی قرار داشتند بالاتر از mg l^{-1} ۱۰۰ بود[۱] که بیش از ده برابر فراتر از حد مجاز زیست محیطی آن (یعنی mg l^{-1} ۱۰ در ژاپن) است.

---

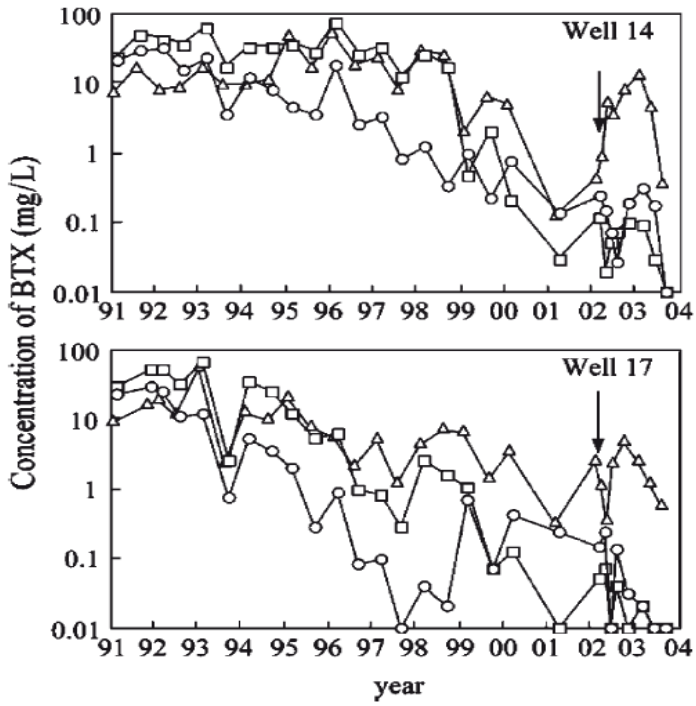
۱. به نظر می‌رسد در کتاب اشتباه تایپی شده و این غلظت درست است (مترجم)



شکل ۱۰-۱ نقشه منطقه مورد مطالعه. منطقه آلوده شده با BTX بلافاصله پس از نشت بنزین (مارس ۱۹۹۲) با خط پیوسته محصور شده، در حالی‌که در قسمتی که با خط‌چین احاطه شده است دقیقاً پیش از شروع MNA (آوریل ۲۰۰۲)، BTX یافت شده است. خطوط ارتفاع در این نقشه ($0/1\ mg\ l^{-1}$ غلظت کل BTX) توسط نرم‌افزار SURFER ویرایش ۷ تعیین شد (Golden Software, Golden, CO, USA). نقطه نشت آلودگی (پمپ بنزین) با چهارگوش توپر، و چاه‌های نمونه‌برداری با دایره‌های توخالی مشخص شده‌اند.

در آوریل ۲۰۰۲، روش پالایش از این سامانه پرهزینه به روش کاهش طبیعی نظارت شده[1] (MNA) تغییر داده شد. آنالیزهای شیمیایی BTX در آب زیرزمینی نشان داد که در برخی مکان‌ها غلظت‌های بنزن در طول دوره MNA کاهش یافت. به عنوان مثال، یک سال پالایش سبب کاهش غلظت بنزن در چاه‌های ۱۴ و ۱۷ از مقداری بیشتر از $۱۰۰\ mg\ l^{-1}$ به زیر حد مجاز زیست محیطی گردید (شکل ۱۰-۲). تجزیه و تحلیل بیشتر عوامل شیمیایی مرتبط با تجزیه زیستی حقیقی (مانند اکسیژن، نیترات، سولفات، آهن دو ظرفیتی، و غلظت‌های بی‌کربنات، پتانسیل اکسایش/ کاهش و شمارش یاخته میکروبی) مشخص کرد که مکان‌هایی که غلظت‌های بنزن در آن‌ها کاهش یافته بود (شامل چاه‌های ۱۴ و ۱۷) بی‌هوازی بودند.

1. Monitored natural attenuation

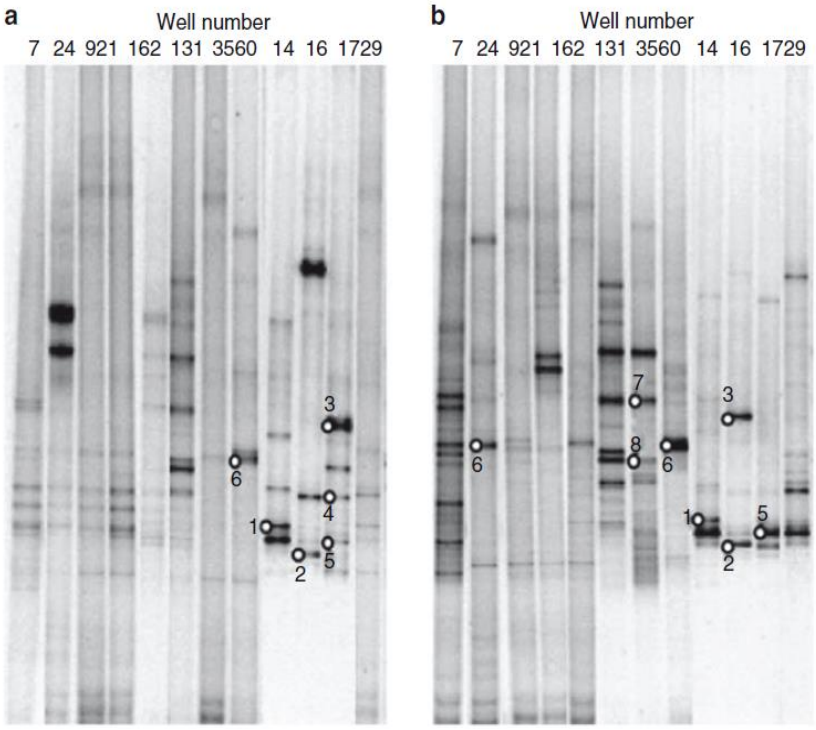


شـــکل ۱۰-۲ تغییرات غلظت بنزن (دایره توخالی)، تولوئن (چهارگوش توخالی)، و زایلن (ســه‌گوش توخالی) در نمونه‌های آب زیرزمینی گرفته شــده از برخی چاه‌ها در مناطق آلوده و مرزی. پیکان نقطه شروع MNA را نشان می‌دهد.

ما روی بررسی جمعیت میکروبی چند نقطه مختلف از سفره آب آلوده متمرکز شدیم. این کار با بررســی قطعات ژن 16S rRNA باکتری‌ها که با واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) تکثیرشده و روی ژل الکتروفورز با شــیب غلظتی واســرشــته‌ســاز[1] (DGGE)، جدا شــده بودند، انجام شــد (تاکاهاتا و همکاران، ۲۰۰۶). شکل ۱۰-۳ بیانگر نیم‌رخ‌های DGGE برای آب زیرزمینی گرفته شده از ۱۲ چاه در نوامبر ۲۰۰۲ و مارس ۲۰۰۳ است. ما دریافتیم که دو نوار (۱ و ۴) به دست آمده از منطقه آلوده با خانواده *رودوسیکلاسه*[2] مرتبط بودند. سه جنس *آزوارکوس*، *دکلرومونـاس*[3]، و *تئورا*[4] و تعداد زیادی از بـاکتری‌هـای نیترات‌زدای تجزیـه‌کننـده هیـدروکربن آروماتیک از این خانواده هســـتند (هِس و

1. Denaturing gradient gel electrophoresis
2. *Rhodocyclaceae*
3. *Dechloromonas*
4. *Thauera*

همکاران، ۱۹۹۷؛ زو و همکاران، ۱۹۹۷). از ســـوی دیگر، دو نوار (۷ و ۸) به دســـت آمده از منطقه مرزی خویشـاوندی نزدیک با جنس *اسفینگوموناس* داشتند که توانایی آن در تجزیه هوازی تعدادی از هیدروکربن‌ها به خوبی شـناخته شـده اسـت (فردریکسون و همکاران، ۱۹۹۵). این آنالیزها نشان می‌دهد که در برخی نقاط این سـفره آب آلوده به بنزین، ممکن اسـت در طول دوره MNA تجزیه زیسـتی بی‌هوازی بنزن رخ داده باشـد. البته از این آنالیزها هیچ مدرک مسـتقیمی مبنی بر حضـور باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن در این مکان‌ها ارائه نمی‌شود.



شـکل ۱۰-۳ نیم‌رخ DGGE برای جمعیت‌های باکتریایی در نمونه‌های آب زیرزمینی گرفته شده در نوامبر ۲۰۰۲ (a) و مارس ۲۰۰۳ (b). نوارهای مشخص شده با دایره‌ها جدا و توالی‌یابی شدند.

۱۰-۳- شناسایی و جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن

همان‌طور که در بالا توضـیح داده شـد، با وجود این‌که پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که تجزیه بی‌هوازی بنزن در مکان‌های آلوده رخ می‌دهد، تنها در یک پژوهش جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن از چنین مکانی با موفقیت صورت گرفته است (کاسای و همکاران، ۲۰۰۶). در آن

مطالعه ما، از کاوش ایزوتوپ پایدار[1] (SIP)، به عنوان یک روش مستقل از کشت برای برقراری ارتباط بین عملکرد جامعه میکروبی با هویت‌های فیلوژنتیکی جانداران کلیدی استفاده کردیم (بوشکر و همکاران، ۱۹۹۸؛ منی‌فاید و همکاران، ۲۰۰۲؛ اُرفان و همکاران، ۲۰۰۱). این روش قادر به شناسایی اعضای مسئول فعالیت‌های ویژه در یک جامعه میکروبی بر اساس وارد کردن ایزوتوپ‌های پایدار (به عنوان مثال، ^{13}C) به درون اجزای میکروبی است. ما از SIP-RNA (RNA- مبتنی بر کاوش ایزوتوپ پایدار[2]) برای نشان‌دار کردن و شناسایی [$^{13}C_6$] جانداران تجزیه‌کننده بنزن استفاده کردیم (کاسای و همکاران، ۲۰۰۶). روش RNA-SIP (در مقایسه با DNA) در وارد کردن ^{13}C به درون RNA نسبتاً کارآمد عمل می‌کند (منی‌فیلد و همکاران، ۲۰۰۲؛ گالاگر و همکاران، ۲۰۰۵). این روش به ویژه زمانی مفیدتر است که احتمالاً تجزیه سوبسترا و سرعت رشد مانند تجزیه بنزن در شرایط بی‌هوازی، کند باشد. افزون بر این، ما از داده‌های فیلوژنتیکی برای جداسازی باکتری‌های نیترات‌زدای تجزیه‌کننده بنزن شناسایی شده به روش RNA-SIP استفاده کردیم (کاسای و همکاران، ۲۰۰۶).

در آن مطالعه (کاسای و همکاران، ۲۰۰۶)، یک نمونه آب زیرزمینی آلوده به BTX از سفره‌ای که در بالا شرح داده شد، آنالیز شد. برای آنالیز SIP، بطری‌ها با آب زیرزمینی پر شدند، یک پذیرنده الکترون (اکسیژن، نیترات، یا سولفات)، مواد غذایی معدنی، و بنزن [$^{13}C_6$] با (غلظت) mM ۲۰۰ به آن‌ها اضافه شد. سپس غلظت بنزن در آب این بطری‌ها در فواصل زمانی مناسب آنالیز شده (شکل a ۱۰-۴) و RNA میکروبی هم استخراج شد. RNA استخراج شده از این نمونه‌ها برای جداسازی RNA سنگین دارای $^{13}C_6$ (RNA از میکروب‌های خورنده بنزن [$^{13}C_6$]) از RNA طبیعی، در معرض اولتراسانتریفوژ قرار گرفت. بخش سنگین جمع‌آوری شده و به عنوان الگو برای تکثیر قطعات 16S rRNA با روش رونویسی معکوس PCR مورد استفاده قرار گرفت. قطعات تکثیر شده به روش DGGE (شکل b ۱۰-۴) برای شناسایی حضور باکتری‌های مرتبط با پذیرنده‌های الکترون متفاوت تجزیه و تحلیل شدند. آنالیز توالی نوارهای اصلی نشان داد که به ویژه هنگامی‌که نیترات به عنوان پذیرنده پایانی الکترون به محیط اضافه شده بود، باکتری‌ها متعلق به جنس *آزوارکوس* هستند (باند ۴ در شکل b۱۰-۴). این نتیجه نشان داد که جمعیت *آزوارکوس* در شرایط کاهش نیترات روی بنزن رشد می‌کند. اخیراً، اولریش و اِدواردز (۲۰۰۳) ثابت کردند که جمعیت میکروبی غالب تجزیه‌کننده بنزن در محیط غنی از نیترات در شرایط احیایی در ارتباط نزدیک با گونه‌های *آزوارکوس* بود. این مورد نیز قابل توجه است که توالی این جمعیت *آزوارکوس* ۱۰۰ درصد

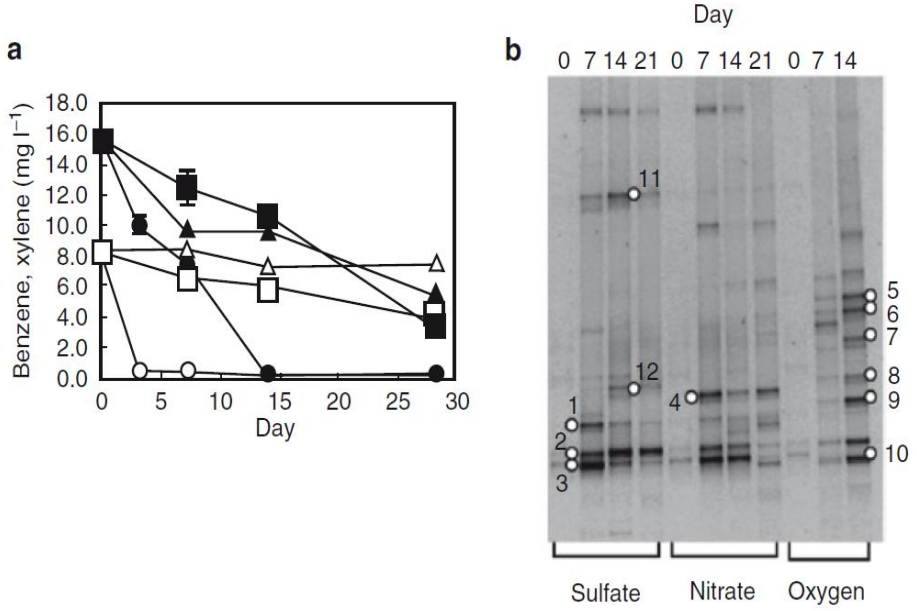
1. Stable isotope probing
2. RNA-based SIP

مشـابه نوار اول در شـکل ۱۰-۳ گرفته شده از آب زیرزمینی آلوده به بنزین است. این موضع نشان می‌دهد که جمعیت *آزوارکوس* ممکن است در مجموعه آلاینده‌های سفره آب زیرزمینی مهم باشد.

به منظور بررســـی توانایی باکتری‌های فیلوتیپ *آزوارکوس* معرفی شـــده در تجزیه بنزن تحت شـــرایط نیترات‌زدایی، ما تلاش کردیم تا آن‌ها را برای آزمایش‌های تجزیه بنزن در محیط کشـــت خالص جداســـازی کنیم (کاســـای و همکاران، ۲۰۰۶). آب زیرزمینی انکوبه شـــده برای SIP تحت شـــرایط نیترات‌زدایی برای ۲۸ روز روی پلیت‌های dCGY پخش شـــده و تحت شـــرایط هوازی[1] و نیترات‌زدایی انکوباسـیون شـدند. ما از محیط dCGY اسـتفاده کردیم زیرا پژوهش‌های قبلی نشان داده بودند که این محیط جداسـازی باکتری‌های مرتبط با بتا*پروتئوباکترها*[2] از لجن فعال را تسـهیل می‌کند (واتاناب و همکارن، ۱۹۹۸؛ واتاناب و همکاران، ۱۹۹۹). در مجموع ۶۰ کلنی برداشـته شد و برای خالص‌سـازی دوباره روی محیط مشـابه به صورت خطی کشت شدند. سپس قطعات ژن 16S rRNA تکثیر شـده به روش PCR از یاخته‌های کلنی‌های جدا شده در پتری‌های جدید در معرض آنالیز DGGE قرار گرفتند. در آنالیز DGGE، موقعیت‌های نوارها با نوار چهارم در شـــکل b ۱۰-۴ روی ژل‌های یکسـان مقایسـه شدند، و تعیین توالی نوکلئوتیدی نوارهایی که تا موقعیت نوار چهارم روی ژل حرکت کرده بودند، برای تایید هویتشـان انجام شـد. در نتیجه، پنج کلنی به دست آوردیم که قطعات ژن 16S rRNA آن‌ها ۱۰۰ درصـــد مشـــابه توالی نوکلئوتیدی در نوار چهارم بود. آنالیز توالی قطعات ژن 16S rRNA (بیشتر از bp ۱۴۵۰) مشخص کرد که توالی آن‌ها اغلب مشابه (بیش از ۹۹ درصـــد شـــباهت) *آزوارکوس اِونســـی*[3] و بســـیار شـــبیه ســـویه ToN1 *آزوارکوس* بودند. *آزوارکوس اِونســـی* ترکیب‌های آروماتیکی مانند بنزوات، تولوئن و فنل را تحت شـــرایط نیترات‌زدایی متابولیزه می‌کند (اندرســـون و همکاران، ۱۹۹۵). ســـویه ToN1 *آزوارکوس نیز* تجزیه‌کننده تولوئن است (رابوس و ویدل، ۱۹۹۵).

۱.با توجه به مطالب بیان شده به نظر کلمه صحیح بی‌هوازی است و در متن کتاب به اشتباه هوازی تایپ شده است. (مترجم)

2. *Betaproteobacteria*
3. *Evansii*

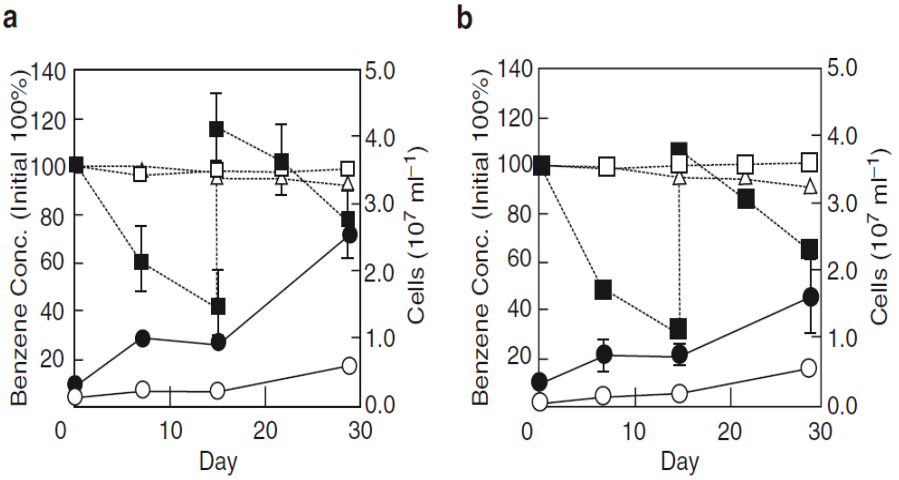


شـــکل ۱۰-۴ a تجزیه بنزن و زایلن در طول انکوباسیون آب زیرزمینی برای SIP. چهارگوش‌های توپر: بنزن در شرایط نیترات‌زدایی، چهارگوش‌های توخالی: زایلن در شرایط نیترات‌زدایی، سه‌گوش‌های تو پر: بنزن در شرایط تولید سولفید،سه‌گوش‌های تو خالی: زایلن در شرایط تولید سولفید، دایره‌های تو پر: بنزن در شرایط هوازی،؛ دایره‌های تو خالی: زایلن در شرایط هوازی. داده‌های هر نقطه میانگین سه تکرار هستند، و نوارهای خطا انحراف معیار را نشـــان می‌دهند. b دوره‌های زمانی نیم‌رخ DGGE برای RNA های جامعه نشـــان‌دار شـــده با ^{13}C گرفته شـــده از آب زیرزمینی را نشـــان می‌دهد که در شـــرایط تولید ســـولفید (ســـولفات)، دنیتریفیکاســـیون (نیترات)، و هوازی (اکسیژن) انکوباسیون شدند. نوارهای شماره‌گذاری شده برای آنالیز توالی DNA جدا شدند.

پنج ســویه جدا شــده را به منظور بررسی توانایی آن‌ها در تجزیه BTX در شرایط نیترات‌زدایی آزمایش کرده (کاســای و همکاران، ۲۰۰۶) و دریافتیم که تنها دو ســویه (DN11 و AN9) قادر به تجزیه بی‌هوازی بنزن بودند (شــکل ۱۰-۵). بنابراین آزمایش‌های رادیورســپیرومتری[1] برای بررســی این‌که آیا بنزن به شــکل بی‌هوازی به وســیله این سویه‌ها معدنی (تبدیل به CO_2) می‌شود، انجام و مشــخص شد که مقدار زیادی از کربن رادیواکتیو که در ابتدا به شکل [^{14}C] بنزن، به محیط اضافه شــده بود در ظرف جمع‌آوری (تله) CO_2 یافت شــده اســت. در آن آزمایش، در نبود نیترات، مقدار

1. Radiorespirometry

قابل‌توجهی از کربن رادیواکتیو در تله CO_2 یافت نشـــد، که نشـــان می‌دهد معدنی شـــدن بنزن با نیترات‌زدایی همراه می‌شود (کاسای و همکاران، ۲۰۰۶).



شـــکل ۱۰- ۵ رشد و تجزیه بنزن توسط سویه DN11 (a) و AN9 (b). در نقطه زمانی که با خطوط عمودی نشان داده شده‌اند محیط‌ها دوباره با بنزن تغذیه شدند. بنزن باقی‌مانده در محیط‌های اصلاح شده با نیترات (چهارگوش‌های توپر)، اصـــلاح نشـــده (چهارگوش‌های توخالی)، و مایه‌زنی نشـــده (ســـه گوش‌های توخالی) اندازه‌گیری شـــد. شـــمار یاخته‌ها در محیط‌های اصـــلاح شـــده با نیترات (دایره‌های توپر) و اصـــلاح نشـــده (دایره‌های توخالی) معلوم شـــده‌اند. داده‌های هر نقطه میانگین ســـه تکرار هســـتند، و نوارهای خطا انحراف معیار را نشان می‌دهند.

کاربرد موفق روش RNA-SIP ثابت کرد که جمعیت *آزوارکوس* در تجزیه بنزن در ســـفره آب زیرزمینی درگیر می‌شود. البته در میان پنج سویه جداشده با فیلوتیپ *آزوارکوس*، تنها دو گونه قادر به تجزیه بی‌هوازی بنزن بودند. این داده‌ها نشان می‌دهد که ناهمگونی عملکرد در میان سویه‌های با فیلوتیـپ *آزوارکوس* وجود دارد و مـارکرهای مولکولی اختصـــاصـــی‌تری از ژن 16S rRNA برای تشـــخیص جمعیت‌های *آزوارکوس* تجزیه‌کننده بنزن از دیگر جمعیت‌های *آزوارکوس* در ســـفره آب آلوده به بنزین ضروری خواهد بود.

از بین دو ســـویه *آزوارکوس* تجزیه‌کننده بی‌هوازی بنزن (یعنی DN11 و AN9)، سویه DN11 را به دلیل فعالیت زیاد برای مطالعه بیشـــتر انتخاب کردیم. آزمایش‌های بررســـی رشد روی سوبسترا نشـــان داد کـه این گونـه می‌توانـد روی بنزن، تولوئن، m- زایلن، و بنزوات به عنوان منابع کربن و انرژی تحت شـــرایط کاهش نیترات رشـــد کند. البته o- و p- زایلن‌ها هم در حضور تولوئن دگرگون شدند (کاسای و همکاران، ۲۰۰۷). از فنول در شرایط بی‌هوازی استفاده نشد. دگرگونی o- زایلن به

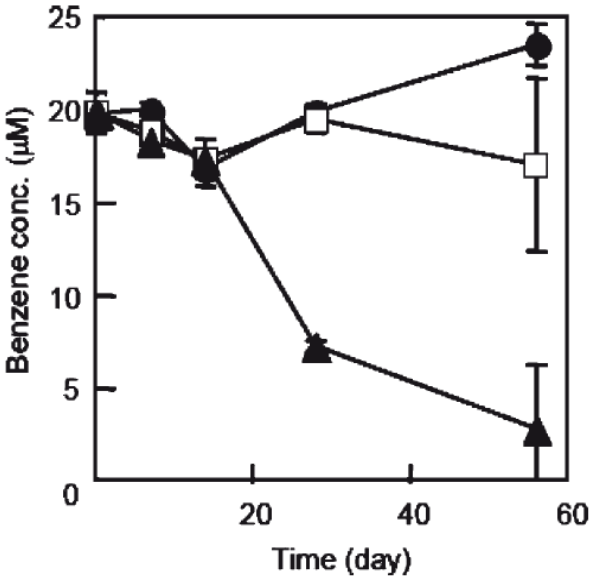
(۲- متیل‌بنزیل) سوکسینات توسط یاخته‌هایی که روی تولوئن رشد می‌کنند نیز برای چندین گونه کاهنده نیترات دیده شد (بِلر و اسپورمن، ۱۹۹۷؛ ایوانز و همکاران، ۱۹۹۲). با این حال در مورد سویه DN11، از دست رفتن (تجزیه) o- زایلن و p- زایلن در حضور تولوئن با تجمع هیچ‌یک از متابولیت‌ها همراه نبود. در نتیجه DN11 افزون بر تجزیه بنزن و تولوئن قادر به تجزیه تمام ایزومرهای زایلن نیز هست که نشان می‌دهد این سویه برای زیست‌پالایی سفره‌های آب آلوده به BTX مفید است. افزون بر این، با توجه به این‌که DN11 نمی‌تواند روی فنول رشد کند، به نظر می‌رسد که این سویه یک مسیر بی‌هوازی تجزیه بنزن را به کار می‌گیرد که متفاوت از مسیر *دکلروموناس* سویه RCB بوده و در آن فنول توسط هیدروکسیلاسیون[1] بنزن تولید می‌شود (چاکربُرتی و کوتز، ۲۰۰۵).

تجزیه بی‌هوازی بنزن در دامنه pH های ۶ تا ۸ و دمای ۱۵ تا ۴۲ درجه سلسیوس دیده شد. بیشترین فعالیت در ۳۰ درجه سلسیوس و pH = ۷ مشاهده شد (کاسای و همکاران، ۲۰۰۷). در دمای ۱۰ درجه سلسیوس نیز فعالیت دیده شد که البته کم بود. در pH = ۵، تجزیه بنزن در طول ۲۰ روز اول دیده شد و پس از آن متوقف شد. برای برآورد ضرایب سینتیکی برای تجزیه بی‌هوازی بنزن (در ۲۵ درجه سلسیوس، pH = ۷)، منحنی‌های تجزیه بنزن را در غلظت‌های مختلف به دست آوردیم. مشخص شد که در غلظت‌های پایین‌تر (تا ۳ mM)، سرعت ناپدید شدن بنزن با افزایش غلظت آن افزایش یافته و در غلظت‌های بالاتر، سرعت ناپدید شدن بنزن با افزایش غلظت کاهش می‌یابد. بنابراین از معادله هالدین[2] (کاسای و همکاران، ۲۰۰۷) برای آنالیز سینتیکی استفاده کرده و ثابت‌های سینتیک را (K_s [ثابت تمایل به سوبسترا[3]]، V_{max} [بیشینه فعالیت نظری[4]]، و K_{SI} [ثابت بازداری[5]]) به ترتیب ۰/۸۲ mM، ۲۴ نانومول در ساعت در میلی‌گرم وزن خشک یاخته و ۱۱ mM برآورد کردیم. نتیجه می‌گیریم که ثابت تمایل سویه DN11 به بنزن آنقدر پایین است که نتواند آن را حذف کرده و غلظتش را تا به زیر حد مجاز استاندارد زیست‌محیطی برساند.

برای ارزیابی توانایی تشدید زیستی DN11 برای پالایش آب زیرزمینی آلوده به بنزن، از آب زیرزمینی که قبلاً از محل یک کارخانه تقطیر زغال سنگ نمونه‌برداری شده بود استفاده کردیم که بنزن آلاینده اصلی آن بود (کاسای و همکاران، ۲۰۰۷). آب زیرزمینی آلوده به بنزن در شرایط بی‌هوازی در بطری‌های آزمایشگاهی انکوباسیون و با مواد غذایی معدنی به تنهایی (نیتروژن، فسفر و نیترات)، یا مواد غذایی همراه با سویه DN11 مکمل شد. تغییر در غلظت بنزن در نمونه‌های آب

1. Hydroxylation
2. Haldane equation
3. Affinity constant
4. Theoretical maximum activity
5. Inhibition constant

زیرزمینی در شکل ۱۰-۶ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که بنزن به طور چشم‌گیری تنها در بطری‌های دارای DN11 تجزیه شده است. در این بطری‌ها، تجزیه بنزن در روز ۷ آغاز شده و تا روز ۵۶ ادامه یافت. در طول این دوره، ۳/۸۸ mmol از بنزن همراه با مصـــرف ۲۲/۵ mmol از نیترات تجزیه شد. نسبت مولی نیترات به بنزن ۵/۸ به خوبی با نسبت تئوری تجزیه بی‌هوازی بنزن همراه با کاهش نیترات ســـازگار اســـت [$C_6H_6 + 6NO_3^- = 6HCO_3^- + 3N_2$] (اســـپورمن و ویدل، ۲۰۰۱).



شـــکل ۱۰-۶ تغییر در غلظت بنزن (غلظت اولیه ۴۲ mM) در طول زیســـت‌پالایی بی‌هوازی آب زیرزمینی آلوده به بنزن. دایره توپر: کنترل (بدون هیچ افزودنی)، چهارگوش توخالی: تحریک زیســـتی (تکمیل با مواد غذایی معدنی و نیترات)، ســـه گوش توپر: تقویت زیستی (تکمیل با مواد غذایی معدنی، نیترات و DN11). داده‌های هر نقطه میانگین سه تکرار هستند و نوارهای خطا، نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشند.

الکتروفورز قطعـات ژن 16S rRNA تکثیر شـــده با PCR روی ژل (DGGE)، و PCR کمی نشـــان داد کـه پس از تجزیـه بنزن ســـویـه DN11 کاهش یافت. پس از کاهش DN11، قطعات ژن16S rRNA نظیر بـاکتری‌هـای خویشـــاوند *اُونِویکســـیا هونگ‌کونگنســـیس*[1] و *پِلوتوماکیولم ایزوفتالیکوم*[2]، نوارهای قوی ایجاد کردند. *پی. ایزوفتالیکوم* یک باکتری اســـت که می‌تواند در محیط

1. *Owenweeksia hongkongensis*
2. *Pelotomaculum isophthalicum*

کشت همراه با میکروب‌های مصرف‌کننده هیدروژن، مانند متانوژن‌ها از بنزوات و هیدروکسی‌بنزوات برای رشد استفاده کند (کیو و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین فرض می‌کنیم که این باکتری ممکن است توانسته باشد برخی از متابولیت‌های واسطه تجزیه بی‌هوازی بنزن را استفاده کند. در چنین موردی، یک جاندار که معرف آن باند ششم است، می‌تواند یک شریک تغذیه‌ای[1] برای *پی. ایزوفتالیکوم* باشد. این احتمال وجود دارد که افزایش پیدا نکردن جمعیت DN11 به سبب این باشد که این دو جاندار متابولیت‌های ثانویه تولید شده از بنزن توسط DN11 را مصرف کرده باشند.

نتایج بالا نشان می‌دهد که سویه DN11 به طور بالقوه برای حذف بنزن از سفره‌های آب زیرزمینی، حداقل از آب زیرزمینی محل کارخانه سابق تقطیر زغال سنگ، مفید است. با توجه به سینتیک‌های تجزیه بنزن، تقویت زیستی DN11 برای حذف نسبی غلظت‌های پایین بنزن اعمال خواهد شد. اگرچه پیشرفت‌های فنی بیشتر (مانند بهینه‌سازی غلظت‌های عناصر غذایی مکمل، توسعه روش‌های کشت میکروبی[2] و ارزیابی‌های خطر) بایستی قبل از آزمایش تقویت زیستی میدانی با DN11 انجام شود ولی عقیده ما بر این است که نتایج پژوهش حاضر امکان جدیدی را برای زیست‌پالایی سفره‌های آب زیرزمینی آلوده به بنزن فراهم کرده است.

۱۰-۴- نتیجه‌گیری

این پژوهش برای توسعه راه‌کار زیست‌پالایی بنزن از آنالیز سفره آب زیرزمینی آلوده به بنزین شروع شده و سپس با شناسایی و جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی تجزیه‌کننده بنزن از آب زیرزمینی ادامه یافت. سویه جدا شده (سویه DN11) توسط تست تقویت زیستی آزمایشگاهی با استفاده از آب زیرزمینی آلوده به بنزن گرفته شده از محل کارخانه تقطیر زغال سنگ سابق ارزیابی شده و مشخص شد که DN11 می‌تواند در تجزیه بنزن در سفره‌های آب زیرزمینی که به غلظت‌های نسبتاً پایین آن آلوده هستند، مفید باشد. بیماری‌زایی DN11 را با استفاده از جانداران مدل، از جمله موش، خرگوش و ماهی کپور ارزیابی کرده‌ایم و هیچ پیامد مضری را روی آن جانداران مشاهده نکرده‌ایم (نتایج منتشر نشده). بر اساس این نتایج، قصد داریم که یک آزمایش تقویت زیستی DN11 را در مقیاس میدانی در محلی که قبلاً کارخانه تقطیر زغال سنگ بوده است، انجام دهیم.

---

1. Syntrophic
2. Mass-cultivation method

منابع

ATSDR (1997) Toxicological profile for benzene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Anders HJ, Kaetzke A, Kampfer P, Ludwig W, Fuchs G (1995) Taxonomic position of aromatic degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera Thauera, as Thauera aromatica sp. nov., and Azoarcus, as Azoarcus evansii sp. nov., respectively, members of the beta subclass of proteobacteria. J Int Syst Bacteriol 45:327–333.

Anderson RT, Lovely DR (1997) Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation. Adv Microb Ecol 15:289–350

Beller HR, Spormann AM (1997) Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. J Bacteriol 179:670–676.

Boschker HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, de Graaf W, Pel R, Parkes RJ, Cappenberg TE (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by 13C-labelling of biomarkers. Nature 392:801–804.

Burland SI, Edwards EA (1999) Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. Appl Environ Microbiol 65:529–533.

Chakraborty R, Coates JD (2005) Hydroxylation and carboxylation — two crucial steps of anaerobic benzene degradation by Dechloromonas strain RCB. Appl Environ Microbiol 71:5427–5432.

Chakraborty R, O'Connor SM, Chan E, Coates JD (2005) Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by Dechloromonas strain RCB. Appl Environ Microbiol 71:8649–8655.

Christensen T, Kjeldsen P, Albrechtsen H, Heron G (1994) Attenuation of pollutants in landfill leachate polluted aquifers. Crit Rev Environ Sci Technol 24:119–202.

Edwards EA, Grbic-Galic D (1992) Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. Appl Environ Microbiol 58:2663–2666.

Evans PJ, Ling W, Goldschmidt B, Ritter ER, Young LY (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and

o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. Appl Environ Microbiol 58:496–501.

Fredrickson JK, Balkwill DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, White DC (1995) Aromatic-degrading Sphingomonas isolates from the deep subsurface. Appl Environ Microbiol 61:1917–1922

Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, Young LY, Kerkhof LJ (2005) 13C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. Appl Environ Microbiol 71:5192–5196.

Grbic-Galic D, Vogel T (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl Environ Microbiol 53:254–260.

Hess A, Zarda B, Hahn D, Häner A, Stax D, Höhener P, Zeyer J (1997) In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylenedegrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. Appl Environ Microbiol 63:2136–2141.

Kasai Y, Takahata Y, Hoaki T, Watanabe K (2005) Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. Environ Microbiol 7:806–818.

Kasai Y, Takahata Y, Manefield M, Watanabe K (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. Appl Environ Microbiol 72:3586–3592.

Kasai Y, Kodama Y, Takahata Y, Hoaki T, Watanabe K (2007) Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzene-degrading bacterium strain DN11. Environ Sci Technol 41:6222–6227.

Lovely DR, Woodward JC, Chapelle FH (1994) Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. Nature 370:128–131.

Lovely DR (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. J Ind Microbiol Biotechnol 18:75–81.

Lovely DR, Coates JD, Woodward JC, Phillips EJP (1995) Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. Appl Environ Microbiol 61:953–958.

Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey M (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. Appl Environ Microbiol 68:5367–5373.

Mehlman MA (1992) Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry. VIII. Health effects of motor fuels: carcinogenicity of gasoline-scientific update. Environ Res 59:238–249.

Orphan VJ, House CH, Hinrichs K, McKeegan KD, DeLong EF (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. Science 293:484–486.

Qiu YL, Sekiguchi Y, Hanada S, Imachi H, Tseng IC, Cheng SS, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y (2006) Pelotomaculum therephthalicum sp. nov. and Pelotomaculum isophthalicum sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in synthrophic association with hydrogenotrophic methanogens. Arch Microbiol 185:172–182.

Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. Arch Microbiol 163:96–103.

Spormann AM, Widdel F (2001) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegradation 11:85–105.

Takahata Y, Kasai Y, Hoaki T, Watanabe K (2006) Rapid intrinsic biodegradation of benzene, toluene and xylenes at the boundary of a gasoline- contaminated plume during natural attenuation. Appl Microbiol Biotechnol 73:713–722.

Ulrich AC, Edwards EA (2003) Physiological and molecular characterization of anaerobic benzenedegrading mixed cultures. Environ Microbiol 5:92–102.

US EPA (1996) Pump-and-treat ground-water remediation. United States Environmental Protection Agency, EPA/625/R-95/005.

US EPA (1999) Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons. United States Environmental Protection Agency, EPA/600/F-98/021.

US EPA (2002) Integrated risk information system (IRIS) on benzene. United States Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC.

Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of

functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. Appl Environ Microbiol 64:4396–4402.

Watanabe K, Teramoto M, Harayama S (1999) An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. Appl Environ Microbiol 65:2813–2819.

Zhou J, Palumbo AV, Tiedje JM (1997) Sensitive detection of a novel class of toluene-degrading denitrifiers, Azoarcus tolulyticus, with small-subunit rRNA primers and probes. Appl Environ Microbiol 63:2384–2390.

فصل یازدهم

پالایش میکروبی فلزها در خاک‌ها

K.A. Hietala and T.M. Roane

۱۱-۱- مقدمه

از میان سامانه‌های آلوده به فلزها، خاک‌های آلوده به فلز به سبب ناهمگنی‌های ساختمانی، فیزیکی، شیمیایی، و زیستی، بیشترین چالش را برای پالایش ایجاد می‌کنند. یکی از موضوع‌های پیچیده در پالایش فلزها این است که فلزها می‌توانند به آسانی دوباره پویا شوند. بنابراین، در مکان‌هایی که فلزها حذف نشده باشند نیاز است که سمیت فلز به طور پیوسته پایش شود. مقدار بیش از اندازه فلز در خاک می‌تواند بر کیفیت هوا، آب سطحی و زیرزمینی تاثیرگذار باشد. با این حال، دانش ما درباره‌ی چگونگی اثرگذاری فلزها بر جانداران، از باکتری‌ها تا گیاهان و حیوانات، و توانایی ما برای خنثی کردن سمیت فلزها در مراحل نخست است. حضور فراوان آلودگی فلزی در مناطق در حال توسعه و صنعتی جهان سبب شده که پالایش خاک‌ها از طریق حذف، مهار و یا سمیت‌زدایی فلزها به نگرانی اصلی تبدیل شود. نمونه‌های اخیر از پیامدهای سلامتی و زیست محیطی آلودگی فلزی شامل آرسنیک در آب آشامیدنی (وانگ و وای، ۲۰۰۴)، سطوح جیوه در ماهی (جِوت و دافی، ۲۰۰۷)، و جذب فلز توسط فرآورده‌های کشاورزی (هاو و همکاران، ۲۰۰۵) هستند. هدف این فصل خلاصه کردن روش‌های مرسوم و پیشرفت‌های اخیر در استفاده از ریزجانداران و متابولیت‌های میکروبی برای رسیدگی به سمیت و پالایش فلزی است.

۱۱-۲- نگرانی در مورد فلزها در خاک

آلودگی فلزی عمدتاً از فعالیت‌های صنعتی و معدن‌کاری حاصل می‌شود (کمیسیون آمریکای شمالی برای همکاری زیست محیطی[1]، ۲۰۰۷). پنج فلز مهمی که ایجاد نگرانی می‌کنند Cu، Cr، Ni، Pb، و Zn هستند. تا آوریل ۲۰۰۷، ۱۲۵۶ جایگاه آلوده در فهرست اولویت‌های ملی آمریکا[2] (NPL) قرار گرفته‌اند و ۶۰ جایگاه هم در مرحله پیشنهادی (به روز رسانی در superfund www.epa.gov/ در دسترس است) هستند. از این جایگاه‌ها، ۶۰۴ (مورد) خاک‌های آلوده به فلز هستند، و ۹۸ درصد از این‌ها با مواد شیمیایی آلی، مانند ۴،۱ دی‌اُکسان، تری‌کلرو اتیلن و BTEX (بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن) هم آلوده می‌شوند که به چالش پالایش اضافه می‌کند. فلزها در محیط مستقیماً بر کیفیت زندگی اثر گذارند. به عنوان مثال، برآورد شده که در حادثه خلیج مینی‌ماتا[3] در ژاپن، ۲۷ تن متیل جیوه توسط شرکت مواد شیمیایی چیسو[4] به درون خلیج منتشر

1. North American Commission for Environmental Cooperation
2. National Priorities List
3. Minimata Bay
4. Chisso Corporation

شـد. مصـرف ماهی آلوده به جیوه سـبب شد که هزاران نفر متحمل سمیت جیوه شدند. تلاش‌هایی برای درک بهتر برهم‌کنش‌های فلز با سـامانه‌های زیسـتی، دگرگونی فلز در محیط و شـناسـایی روش‌هایی برای کاهش غلظت فلز در حال انجام است.

به سـبب غیرقابل کنترل بودن (شرایط) محیطی، فلزها چالش‌های پالایشی منحصر به فردی را ایجاد می‌کنند. فلزها را نمی‌توان تجزیه کرد. بنابراین پالایش فلزی خاک‌ها به معنی کاهش سـمیت فلز است نه حذف آن. برای مثال، حضور رس‌ها و مواد آلی در خاک‌ها سبب پیوند و کمپلکس فلزی و کاهش واکنش‌پذیری فلز و بنابراین سـمیت آن می‌شود. هر چند با تغییر شرایط خاک، شامل pH و پتانسـیل اکسـایش و کاهش، فلزها می‌توانند از نظر شـیمیایی فعال و از نظر زیستی سمی شوند. ماهیت پویای برهم‌کنش فلزها در خاک‌ها سـبب دشـوار شـدن پالایش آن‌ها می‌شـود، و به جز مواردی که مقدار فلز به اندازه چشـم‌گیری کاهش یافته باشـد، خاک‌های متاثر از فلز به نظارت و مراقبت طولانی‌تری نیاز دارند.

۱۱-۳- برهم‌کنش فلزها در خاک

سمیت فلز می‌تواند به چندین روش تعریف شود: (۱) چگونه یک فلز بر فرایندهای زیستی در سطح یاخته تاثیر می‌گذارد؟ (۲) پیامد یک فلز بر جانداران چند سـلولی چیسـت؟ (۳) چگونه یک فلز فرایندهای زیسـت‌بوم را تغییر می‌دهد؟ در حالی‌که بودن فلزها در یک خاک ممکن اسـت سـمیت بالقوه را نشـان دهد، اما مقدار کل فلز موجود لزوماً منعکس کننده سمیت واقعی نیست. در خاک‌ها دو راه برای انـدازه‌گیری فلزهـا وجود دارد: مقـدار کـل فلز و فلز واکنش‌پذیر زیسـتی یا مقدار فلز زیسـت‌فراهم. زیسـت‌فراهمی را می‌توان این گونه تعریف کرد: «مقداری از یک ماده شـیمیایی که می‌تواند توسـط جاندار زنده جذب شـود» (کِلی و همکاران، ۲۰۰۲). فلزهای زیسـت‌فراهم سـمیت مسـتقیم برای یاخته دارند که این امر در ارزیابی خطر مورد توجه قرار گرفته است. در ارزیابی خطر خاک، زیسـت‌فراهمی شـامل مقداری از یک ماده اسـت که می‌تواند «واجذب شـود، حل شود یا به واسـطه روش دیگری که در آن رخ می‌دهد از محیط جدا شـده و برای جذب فراهم شـود» (کِلی و همکـاران، ۲۰۰۲). بنابراین هنگام ارزیابی مقدار آلودگی در یک جایگاه، تعیین زیسـت‌فراهمی فلز مهم است (آلوارنگا و همکاارن، ۲۰۰۸).

تعدادی از عوامل محیطی، شـامل گنجایش تبادل کاتیونی خاک، pH و پتانسـیل اکسـایش و کاهش بر جزبندی فلز موثر بوده و از این طریق بر زیست‌فراهمی آن اثر می‌گذارند. یکی از مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر زیسـت‌فراهمی فلز در خاک گنجایش تبادل کاتیونی (CEC) اسـت که گنجایش یک خاک برای تبادل یون‌های با بار مثبت در حد فاصـل محلول خاک- خاک بوده که وابسـته به مواد آلی و مقدار رس خاک اسـت. به بیان کلی، خاک‌هایی که (مقدار) رس در آن‌ها غالب اسـت،

CEC بالاتری را نشـان می‌دهند. در پژوهشـی که توسـط جارکی و لال (۲۰۰۵) انجام شد مشاهده شد که یک خاک لوم سیلتی از جنوب غربی اوهایو[1] با مقدار رس g/kg ۱۱۲ مقدار گنجایش تبادل کاتیونی cmol/kg ۳۰/۷ داشـته ولی گنجایش تبادل کاتیونی یک خاک لوم رسـی از شـمال غربی اوهایو با g/kg ۳۷۶ رس، cmol/kg ۴۹/۹ بود. در خاک‌های با CEC بالاتر گرایش زیسـت‌فراهمی فلزها کم می‌شـود. زیرا آن‌ها (فلزها) به شدت توسط ماتریکس (پیکره) خاک جذب می‌شوند. افزون بر این، مواد آلی بـه راحتی فلزهـا را جـذب می‌کننـد و از طریق ایجـاد پیوند فلز با گروه‌های عامل آنیونی، مانند کربوکسـیل، کربونیل، فنولیک، هیدروکسـیل و گروه‌های استری، زیست‌فراهمی فلز را کاهش می‌دهند. البته برخی از این‌ها کمپلکس‌های فلزی محلول و برخی دیگر مانند آن‌هایی که در اسـیدهای هیومیک با وزن مولکولی بالا دیده می‌شـوند، کمپلکس‌های نامحلول تشـکیل می‌دهند (برادل، ۲۰۰۴). اسـیدهای آلیفاتیک سـاده نیز می‌توانند کلات‌های فلزی محلول تشـکیل دهند. کمپلکس‌های محلول همچنان نگران‌کننده هسـتند زیرا باوجود این‌که زیست‌فراهمی فلز کمتر شده اما هم‌چنان پویایی بالایی دارد.

در شـرایط اسـیدی، به طور کلی فلزهای کاتیونی به شکل گونه‌های یونی آزاد یا گونه‌های آلی-فلزی محلول یافت می‌شـوند. ساندرین و مایر (۲۰۰۲) نشان دادند که حلالیت و گونه‌بندی کادمیوم با تغییر pH تغییر می‌کند. اندازه کادمیوم یونی (Cd^{2+}) که در pH = ۴، ۴۴ $mg\ l^{-1}$ بود به $mg\ l^{-1}$ ۴ در pH = ۷ رسـید و بخشـی هم به فسـفات کادمیوم نامحلول ($Cd_3(PO_4)_2$) و مقادیر کمی کادمیوم هیدروکسـیله شـده تک ظرفیتی ($CdOH^+$) تبدیل شـد. در جدول ۱۱-۱ گونه‌های فلزی غالب در خاک‌ها به عنوان تابعی از pH آمده است.

1. Ohio

جدول ۱۱- ۱ گونه‌بندی فلزها در خاک به عنوان تابعی از pH (هیز و ترایناء ۱۹۹۸)

فلز	pH خاک< ۷	pH خاک > ۷
نقره (Ag)	Ag^+, AgCl	Ag^+, organic-Ag
آرسنیک (As)	$As(OH)_3$, $H_2AsO_4^-$	$HAsO_4^{2-}$, AsO_3^{3-}
بریلیوم (Be)	Be^{2+}	$Be(OH)_3^-$, $Be(OH)_4^{2-}$
کادمیوم (Cd)	Cd^{2+}, $CdSO_4$, $CdCl^-$	Cd^{2+}, $CdCl^-$, $CdSO_4$, $CdHCO_3^+$
کبالت (Co)	Co^{2+}, $CoSO_4$	$Co(OH)_2$
کروم (Cr)	$Cr(OH)^{2+}$, CrO_4^{2-}	$Cr(OH)_4^-$, CrO_4^{2-}
مس (Cu)	Cu^{2+}, $CuCl^-$, organic-Cu	$CuCO_3$, $CuHCO_3^+$, organic-Cu
جیوه (Hg)	Hg^{2+}, $Hg(Cl)_2$, CH_3Hg^+, organic-Hg	$Hg(OH)_2$, organic-Hg
منگنز (Mn)	Mn^{2+}, $MnSO_4$, organic-Mn	Mn^{2+}, $MnSO_4$, $MnCO_3$, $MnHCO_3^+$
مولیبدن (Mo)	H_2MoO_4, $HMoO_4^-$	$HMoO_4^-$, MoO_4^{2-}
نیکل (Ni)	Ni^{2+}, $NiSO_4$, $NiHCO_3^+$, organic-Ni	$NiCO_3$, $NiHCO_3^+$, Ni^{2+}
سرب (Pb)	Pb^{2+}, $PbSO_4$, $PbHCO_3^+$, organic-Pb	$PbCO_3$, $PbHCO_3^+$, $PbOH^+$, organic-Pb
آنتیموان (Sb)	$Sb(OH)_2^+$, $Sb(OH)_3$, $Sb(OH)_5$, $Sb(OH)_6^-$	$Sb(OH)_4^-$, $Sb(OH)_6^-$
سلنیوم (Se)	$HSeO_3^-$, SeO_4^{2-}	SeO_3^{2-}, SeO_4^{2-}
تالیم (Tl)	Tl^+, $Tl(OH)_3$	Tl^+, $Tl(OH)_4^-$
وانادیوم (V)	VO^{2+}, VO_2^+, polyvandates	$VO_2(OH)_2^-$, $VO_3(OH)^{2-}$
روی (Zn)	Zn^{2+}, $ZnSO_4$, organic-Zn	$ZnHCO_3^+$, $ZnCO_3$, Zn^{2+}, $ZnSO_4$, organic-Zn

حلالیت و واکنش‌پذیری شیمیایی و در نتیجه زیست‌فراهمی گونه‌های فلزی متفاوت است. pH خاک همچنین می‌تواند بر جذب فلز روی ذرات خاک و مواد آلی موثر باشد، به طوری‌که با افزایش pH جذب الکترواستاتیک بین فلز و اجزای خاک نیز به سبب افزایش CEC، افزایش می‌یابد. با افزایش اتصال (پیوند) به سطوح و کاهش حلالیت، pH بالاتر سبب زیست‌فراهمی کمتر فلز می‌شود. سامانه‌های اسیدی با کاهش پیوند فلز تمایل به افزایش حلالیت آن دارند و بنابراین غلظت زیست‌فراهم فلز را افزایش می‌دهند. از سوی دیگر، گونه‌های فلزی آنیونی، مانند کرومات (CrO_4^{2-})، وانادات (VO_4^{3-})، و سلنات (SeO_4^{2-})، تمایل به جذب در pHهای پایین‌تر دارند. به عنوان نمونه،

نشان داده شده است که گونه‌های فلزی آنیونی در ۳-۲ = pH روی کیتین با بیشترین کارایی جذب می‌شوند (نیو و والسکی، ۲۰۰۳).

پتانسیل اکسایش- کاهش خاک نیز بر زیست‌فراهمی فلز اثرگذار است. در شرایط اکسایشی هوازی (صفر تا ۸۰۰+ میلی‌ولت)، فلزها بیشتر به شکل نمک‌های محلول و شکل‌های کاتیونی، مانند، $CdCl_2$ و Cd^{2+} یافت می‌شوند. ولی در خاک‌های اشباع بی‌هوازی با پتانسیل اکسایش- کاهش پایین (صفر تا ۴۰۰- میلی‌ولت) فلزها تمایل دارند به شکل سولفیدهای فلزی، مانند، CdS و PbS و کربنات‌های فلزی نظیر $CdCO_3$ رسوب کنند. در پژوهش اخیر توسط کورنو و همکاران (۲۰۰۷)، تشکیل CdS در یک خاک آلوده به فلز زمانی رخ داد که شرایط خاک شدیداً کاهشی (کاهش پتانسیل احیا (pe) از ۹/۲ به ۳/۶-) بود.

فعالیت‌های میکروبی خاک می‌توانند ویژگی‌هایی از خاک را که سبب تغییر گونه‌بندی فلز می‌شوند عوض کنند (مَجِوسکا و همکاران، ۲۰۰۷؛ کاریلو-گُندالز و همکاران، ۲۰۰۶؛ آمِزکیوآ-آلیئری و همکاران، ۲۰۰۵). تجزیه میکروبی مواد آلی می‌تواند سبب افزایش مکان‌های قابل دسترس برای پیوند فلزی شود. فرآورده‌های دفعی میکروبی مانند اسیدهای آلی و الکل‌ها می‌توانند pH را تغییر داده و سبب افزایش یا کاهش حلالیت فلز شوند. مَجِوسکا و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش اسید سیتریک، اسید استیک، سیدروفورهای کاتکول و کلات کننده‌های آهن تولید شده میکروبی با کاهش دادن pH از ۶/۵ به ۵ پس از ۴۸ ساعت می‌توانند در پویایی کادمیوم درون خاک‌ها نقش داشته باشند. افزون بر این پیامدهای زیستی، عوامل غیرزیستی مانند بارندگی هم می‌توانند گونه‌بندی فلز را تغییر دهند.

برای ارزیابی دقیق زیست‌فراهمی فلز در محیط کارهای زیادی در حال انجام است. روش‌های متداول ارزیابی شامل استخراج با آب (کوک و همکاران، ۲۰۰۲)، استخراج با اسید (لارنر و همکاران، ۲۰۰۷)، استخراج با خنثی کردن بار (کساب و رُآن، ۲۰۰۶) و استخراج‌های پی‌در پی سه مرحله‌ای (آلوارنگا، ۲۰۰۸؛ ژو و همکاران، ۲۰۰۶) هستند. اگرچه ارزیابی‌های زیستی سمیت به راحتی قابل اندازه‌گیری نیستند، اما می‌توانند خطرهای زیست‌بومی یک فلز را ارزیابی کنند (آلوارنگا و همکاران، ۲۰۰۸؛ کوک و همکاران، ۲۰۰۲). آلوارنگا و همکاران (۲۰۰۸) از ارزیابی‌های شیمیایی و زیستی برای تعیین زیست‌فراهمی فلز در یک خاک معدن استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترِ فلز به شکل ناپویا و غیرقابل کاهش و اکسید شدن باقی مانده و کمتر از ۱۰٪ آن در فاز محلول در آب/ تبادلی حضور داشت. تا کنون، دقت این روش‌ها برای تعیین غلظت تاثیرگذار فلز بر سامانه‌های زیستی مشخص نشده است. کارهای جدیدتر استفاده از ریزجاندارانی مانند باکتری‌ها را به عنوان حس‌گرهای زیستی برای ارزیابی سمیت فلز مطرح می‌کنند (یاگی، ۲۰۰۷؛ هُرسول و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویتز و همکاران، ۲۰۰۲). به عنوان مثال، از *ایشریشیا کولای* pUCD607 HB101 که

دارای اُپرون lux *ویبریو فیشری*[1] است، به عنوان یک حس‌گر زیستی برای تعیین Ni، Cu و Zn کل و محلول در آب استفاده شد. کاهش در زیست‌تابی[2] نشان دهنده پاسخ به سمیت فلز بود (هُرسول و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ حس‌گر زیستی *آرمیلاریا ملا*[3]، که به طور طبیعی زیست‌تابی دارد، برای تشخیص Cu و Zn، علاوه بر ترکیب‌های آلی سمی مناسب بود (ویتز و همکاران، ۲۰۰۲). در دیگر پژوهش‌ها از فعالیت‌های میکروبی مانند تعیین دوز اکولوژیکی[4] (ED_{50}) فلز (رنلا و همکاران، ۲۰۰۳؛ مورنو و همکاران، ۲۰۰۱) و فعالیت‌های آنزیمی ویژه (بیلی‌اِوا و همکاران، ۲۰۰۵؛ مَک‌لاقلین و همکاران، ۲۰۰۰؛ دیک، ۱۹۹۷) به عنوان بازتابی از سمیت زیستی فلز استفاده می‌کنند. صرف‌نظر از روش اعمال شده، غلظت‌های کل فلز همیشه بیشتر از غلظت‌های زیست‌فراهم آن است (جدول ۱۱-۲).

جدول ۱۱-۲ تغییر در زیست‌فراهمی در برابر غلظت کل فلز در دو خاک آلوده متفاوت

فلز	عصاره خاک[a] (mg l)	کل فلز (وزن خشک mg/Kg)
آرسنیک[b]	۰/۲۲	۲۵
کادمیوم[c]	۰/۰۱	۳
کروم[c]	۰/۰۹	۲۲
مس[c]	۰/۱۱	۳۶۲
منگنز[b]	۲/۰۳	۱۵۲
مولیبدن[b]	۰/۰۵	۵
نیکل[c]	۰/۰۴	۱۵
سرب[c]	۰/۱	۱۲۵۰
روی[c]	۰/۰۴	۲۵۴

[a] از آب به عنوان حلال عصاره‌گیری استفاده شده است

[b] برگرفته از کوک و همکاران (۲۰۰۲)، پس از ۲۴ ساعت

[c] برگرفته از آلوارنگا و همکاران (۲۰۰۸)

1. *Vibrio fischeri*
2. Bioluminescence
3. *Armillaria mellea*
4. Ecological dose

۱۱- ۴- روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای پالایش فلزی

دو روش اصـــلی برای پـالایش مرســـوم خـاک‌هـای آلوده بـه فلز وجود دارد: حذف فلز از خاک یا ناپویاســازی گونه‌های فلزی در خاک. با توجه به این‌که فلزها نمی‌توانند تجزیه شـوند، حفاری خاک آلوده یک روش حذف اسـت. اما چون در بیشـتر جایگاه‌ها حجم وسـیعی از خاک آلوده وجود دارد، این روش هزینه‌بر و غیرممکن می‌شود.

۱۱-۴-۱- حذف فلز

شستشوی خاک فلزها را حل می‌کند، پس ممکن است آن‌ها از سامانه خاک شسته شده و در زه‌آب بازیافت شـوند. عوامل رایج آبشویی‌که برای واجذب فلزها از مواد آلی و ذرات خاک استفاده می‌کنند شـامل اسـیدها و کلات‌کننده‌هایی مانند EDTA (اتیلن دی‌آمین تترا اسـتیک اسـید[1]) و DTPA (دی‌اتیلن تری نیتریلو پنتا استیک اسید[2]) هستند. هرچه فلز محلول‌تر باشد، عوامل کمپلکس‌کننده بیشـــتر به آن متصـــل شـــده و فلز را از خاک خارج می‌کنند. جانگ و همکاران (۲۰۰۷) یک روش شـســتشـوی متوالی را با اسـتفاده از اسـید هیدروکلریک و هیدروکسـید سـدیم به منظور کاهش آرسـنیک در ضایعات معدن‌کاری در کره مطرح کردند. متاسفانه، شستشوی خاک با اسیدهای قوی می‌تواند با تغییر سـاختار فیزیکو- شـیمیایی خاک بر توان تولید و تنوع زیسـتی خاک تاثیر بگذارد. رید و همکاران (۱۹۹۶) دیدند که pH نهایی خاک پس از شـســتشـو با HCl ۰/۱ نرمال، به حدود یک رسـید. افزون بر این، کلات‌کننده‌ها ممکن اسـت به سـختی تجزیه شده و حذف آن‌ها از زه‌آب خاک دشوار باشد (هونگ و همکاران، ۲۰۰۲).

سورفکتنت‌ها نیز که در شستشوی خاک استفاده می‌شوند، مولکول‌های آمفی‌پاتیکی هستند که می‌توانند کشـش سطحی آب را کاهش دهند. آن‌ها همچنین می‌توانند با فلز تشکیل کمپلکس داده و غلظت فلزهای پیوندی در فاز محلول را افزایش دهند. سورفکتنت‌ها و لیگاندها، مانند تریتون X و ســـاپونین نشـــان داده‌انـد که به طور جداگانه و همراه با هم، به واجذب فلزها از ذرات خاک کمک می‌کنند (چانگ و همکاران، ۲۰۰۵؛ شـــین و همکاران، ۲۰۰۵؛ هونگ و همکاران، ۲۰۰۲). شـــین و همکاران (۲۰۰۵) نشـان دادند که هنگامی‌که یک خاک لوم شنی با تریتون X و لیگاند یدید سدیم شـســته شـد بیش از ۶۱ درصد کادمیوم آن واجذب شد. شستشوی فیزیکی یا سایش خاک‌ها بدون افزودنی‌های شـیمیایی نیز می‌تواند به کاهش مقدار فلز در خاک به واسـطه حذف ذرات رس دارای فلزهای پیوندی کمک کند (پتروزلی و همکاران، ۲۰۰۴).

---

1. Ethylene diamine tetraacetic acid
2. Diethylene trinitrilo pentaacetic acid

۱۱-۴-۲- ناپویایی فلز

پالایش شیمیایی خاک‌ها با عوامل اکسیدکننده و کاهنده شامل تبدیل فلزها به گونه‌های بی‌اثر است (آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۴). مواد شیمیایی استفاده شده شامل اُزون، پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت‌ها، پرمنگنات پتاسیم، معرف فنتون (پراکسید هیدروژن و آهن)، کلرین، و دی‌اکسید کلرین است. غلظت کادمیوم در عصاره یک خاک آلوده به بنزن که با سرب و کادمیوم نیز آلوده بود پس از تیمار با معرف فنتون حدود ۵۰ درصد کاهش یافت (براگاتو و تنوریو، ۲۰۰۷). آهک‌دهی خاک‌ها (افزودن کربنات کلسیم) روش دیگری برای افزایش pH خاک به منظور کاهش پویایی و سمیت فلز است. کوکیئر و چینی (۲۰۰۱) نشان دادند که آهک‌دهی میدانی خاک آلوده به نیکل که در آن رشد گیاه امکان‌پذیر نبود، سمیت نیکل را کاهش داد. به طوری که گیاه توانست در آن خاک رشد کند. افزودن مواد آلی به خاک‌ها ضمن افزایش گنجایش تبادل کاتیونی (CEC) خاک، به جذب گونه‌های فلزی آزاد نیز کمک می‌کند (برادل، ۲۰۰۴).

روش‌های فیزیکی ناپویاسازی شامل پوشاندن سطح خاک آلوده[1]، جامد کردن/ تثبیت کردن (S/S) و تبدیل کردن به شیشه هستند. استقرار پوشش در خاک روشی برای پوشش خاک‌های آلوده و به منظور محصور کردن آلاینده‌ها است. به عنوان مثال، پوشش‌های گیاهی با موفقیت در خاک‌های آلوده به سرب استفاده شده‌اند. درختچه‌های بومی، علف‌ها و گل‌های وحشی قادر به تثبیت آلودگی در یک خاک آلوده صنعتی دارای mg/kg ۱۰۰۰۰-۳۰۰۰ سرب بودند (فتزر و همکاران، ۲۰۰۶). ته‌نشست‌های آلوده عموماً به جای لایروبی، پوشانده می‌شوند. زیرا لایروبی مناطق بدون اکسیژن را با شرایط اکسیداسیون که سبب انحلال فلز می‌شود، جایگزین می‌کند (زومیس و همکاران، ۲۰۰۱). در روش پایدار کردن/ منجمد کردن (S/S) از سیمان، ($CaSO_4$) بدون آب یا بیتومن[2] (شبیه قیر) برای تثبیت فیزیکی خاک آلوده استفاده می‌کنند. مهار فیزیکی، آب‌شویی و زیست‌فراهمی فلز را کاهش می‌دهد. بررسی کلی فن‌آوری‌های S/S در پالایش توسط پریا و یوت (۲۰۰۶) انجام گرفته است. در نهایت، روش شیشه‌ای کردن از حرارت (۲۰۰۰- ۱۶۰۰ درجه سلسیوس) برای ذوب خاک آلوده و تبدیل آن به مواد مشابه شیشه و مقاوم به آب‌شویی استفاده می‌کند. در پژوهشی که توسط میگودا و همکاران (۱۹۹۶؛ ۱۹۹۹) انجام شد، پس از شیشه‌سازی در خاک‌های دارای TCLP (سمیت تعیین شده به روش آبشویی[3])، غلظت کروم در زه‌آب از بیش از $mg\ L^{-1}$ ۳۰ به کمتر از $mg\ L^{-1}$ ۵ کاهش یافت. جو (۲۰۰۶) نشان داد که از تابش میکروویو می‌توان برای شیشه‌ای کردن خاک‌ها در مدت ۳۰ دقیقه استفاده کرده و TCLP را در کمتر از

1. Capping
2. Bitumen
3. Toxicity characteristic leaching procedure

$mg\ L^{-1}$ ۱ سرب بعد از ۶ سال حفظ کرد. با توجه به پایداری خاک‌های شیشه‌ای شده، استفاده دوباره از آن‌ها در مواد ساختمانی امکان‌پذیر است.

۱۱-۴-۳- روش‌های جدید جلوگیری از آلودگی فلز

پر کردن معادن حفاری شده شامل پرکردن دوباره حفره‌های معدنی تازه یا متروک است که در آن بقایای معدن وجود دارد (اسکوبل و همکاران، ۲۰۰۳). از بقایای معدن می‌شود به عنوان بخشی از مواد پرکننده حفره‌های معدن استفاده کرد. این بقایا با یک اتصال دهنده مانند سیمان تثبیت می‌شوند. از نظر زیست محیطی، پرکردن دوباره معدن متروک به کاهش اکسیداسیون سولفیدهای فلزی و بنابراین کم‌شدن زه‌آب اسیدی معدن کمک می‌کند. دریک پژوهش میدانی در معدنی زیرزمینی که با بیش از ۵۰ درصد بقایای سولفیدی پر شده بود، شدت اکسایش پس از ۱۴ روز کاهش یافته و پس از ۸۰ روز تثبیت شده و در نتیجه تشکیل زه‌آب اسیدی معدن را کاهش داد (اولت و همکاران، ۲۰۰۶). نهدی و طارق (۲۰۰۷) یک بررسی کلی از فن‌آوری‌های تثبیت بقایای اضافی معدن تهیه کردند.

پالایش ضایعات فلزی پیش از آزادسازی به محیط یک روش ایده‌آل برای پالایش است. شرکت مواد شیمیایی PELLU یک سامانه حذف فلز یک مرحله‌ای برای پساب را طراحی کرده است(www.pelluchemicals.com). این سامانه فلزها را از خشک‌شویی‌های صنعتی، آب‌کاری‌ها، کارگاه‌های تعمیر هواپیما، بقایای معدن و پساب پالایشگاه‌های فلز که شامل Cd، Pb، Cu و Cr است حذف می‌کند. برای این کار، آب آلوده به درون یک راکتور، که در آن یک ماده شیمیایی اختصاصی تا pH مناسب درون مخزن تزریق می‌شود، پمپ می‌شود. سپس پلیمری برای اتصال فلزها اضافه می‌شود و سرانجام ته‌نشست حاصل برای دفن شدن جمع‌آوری می‌شود. مواد شیمیایی اختصاصی می‌توانند بسته به نوع پساب تحت پالایش تغییر کنند. یکی دیگر از فرآورده‌های تجاری موجود در بازار، LeadX نام دارد که یک ماده شیمیایی افزودنی دانه‌ای شکل بوده و می‌تواند برای کاهش سطوح زیست فراهمِ فلز، با خاک مخلوط شود (www.leadx.org). با افزودن LeadX، بر مبنای تعیین TCLP، فلزهایی مانند Ag، Cd، Cr، Hg و Pb بیش از ۸۰ درصد کاهش داده شدند.

۱۱-۵- برهم‌کنش‌های میکروبی با فلزها

فلزها برای همه سامانه‌های زیستی از میکروبی تا گیاهی و حیوانی سمی هستند. ریزجانداران، تا حدودی بیشتر از سایرین تحت تاثیر قرار می‌گیرند که علت آن اندازه کوچک آن‌ها و درگیری مستقیم با محیط‌شان است (پاتل و همکاران، ۲۰۰۷؛ سارت و همکاران، ۲۰۰۵؛ گیلر و همکاران،

۱۹۹۹). سـمیت فلزی بر همه فرایندهای یاخته مانند متابولیسم، صحت تقسیم مواد ژنتیکی و رشد پیـامـدهـای منفی دارد. نبود جمعیت‌های باکتریایی در خاک‌های آلوده به فلز بر چرخه عنصـــری، پالایش فلز با ترکیب‌های آلی، رشـد گیاه، و سـاختمان خاک اثر می‌گذارد. رنلا و همکاران (۲۰۰۳؛ ۲۰۰۵) دریافتند که ترکیب‌های ویژه‌ای از فلزها مانند Cu+Zn و Ni+Cd در خاک‌ها سبب کاهش فعـالیت ریزجانداران به دلیل تغییر در تنوع باکتریایی می‌شـــوند. پالمورس و همکاران (۲۰۰۷) نیز مشـــاهده کردند که در جوامع میکروبی تحت تاثیر ســـرب توانایی تجزیه هیدروکربن خاک کاهش یـافـت. اســـتفانویچ و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که فلزها جوامع قارچی و باکتریایی را به شـــکل متفاوتی تحت تاثیر قرار می‌دهند. در پژوهش آن‌ها، آلودگی سرب و روی خاک ناشی از فعالیت‌های معـدن‌کـاری ســـبب کاهش تنوع عملکردی باکتریایی شـــده ولی تنوع عملکردی قارچی در میان جانداران قابل کشـت افزایش یافت. آنالیزهای محاسباتی انجام شده توسط گانز و همکاران (۲۰۰۵) کاهش ۹۹/۹ درصـدی در تنوع باکتریایی خاک‌های متاثر از فلزهای بسـیار سـمی را نشـان داد به طوری که گونه‌های کمیاب ترجیحاً از دســـت رفتند. در حالی‌که این پژوهش‌ها و ســـایرین (وِبر و همکاران، ۲۰۰۸؛ نیکلینسکا و همکاران، ۲۰۰۶؛ باس و همکاران، ۲۰۰۵) دریافتند که سمیت فلزی می‌تواند شـــدت تنفس، مصـــرف منبع کربن و الگوهای تجزیه را تغییر دهد، اما پیامدهای طولانی مدت چنین تغییراتی در تنوع میکروبی عملکردی نامشـخص باقی مانده اسـت. برخی شـواهد نشان می‌دهـد کـه فعـالیـت‌هـای جامعه میکروبی به محض پالایش فلزی بهبود می‌یابد. دِمورا و همکاران (۲۰۰۵) پس از پالایش در محل خاک‌های آلوده به فلز با ترکیب آلی دریافتند که عملکرد میکروبی، شامل زیست توده، معدنی شدن کربن و فعالیت‌های دهیدروژناز بازیابی می‌شود.

۱۱-۶- دگرگونی‌های میکروبی فلزها

دگرگونی‌های متعددی از فلزها با واســطه میکروبی شـــناســـایی شـــده‌اند (رُآن و پِپر، ۲۰۰۲؛ نیس، ۱۹۹۹) که در بســیاری از آن‌ها ممکن اســت فلزها در محیط غیرپویا یا پویا شـــوند (جدول ۱۱-۳). دگرگونی‌های میکروبی فلزها اغلب نتیجه‌ی ساز وکار مقاومت فلز که شامل کمپلکس و رسوب است و همچنین حلالیت آن‌ها هستند که راهبردهای زیست‌پالایی را پیشنهاد می‌کنند.

جدول ۱۱-۳ ساز و کارهای مقاومت به فلز میکروبی

فلز	ساز و کار مقاومت	ریزجاندار	مثال‌ها
نقره	ترسیب داخل یاخته‌ای	*لاکتوباسیلوس*[1]	نایر و پرادیپ (۲۰۰۲)
آرسنیک	کاهش، انتشار به خارج، ترسیب داخل یاخته‌ای	*سودوموناس* As-1	پاتل و همکاران، (۲۰۰۷)
طلا	ترسیب خارج و داخل یاخته‌ای	*لاکتوباسیلوس*، *ترمومونوسپورا*[2]	نایر و پرادیپ (۲۰۰۲)؛ احمد و همکاران، (۲۰۰۳b)
کادمیوم	ترسیب خارج و داخل یاخته-ای، انتشار به خارج، کاهش	*گلوتسه ماگنا*[3]، *استافیلوکوک اورئوس*[4]، *فوزاریوم اکسی‌اسپوروم*[5]، *سودوموناس آئروژینوزا* BS-2، *سودوموناس* H1	محمد (۲۰۰۱)؛ نیس و سیلور (۱۹۸۹)؛ احمد و همکاران، (۲۰۰۲)؛ جووارکار و همکاران، (۲۰۰۷)؛ روآنا و همکاران، (۲۰۰۱)
کروم	ترسیب خارج یاخته‌ای، کاهش	*استرپتومایسس*	آموروس وهمکاران، (۲۰۰۱)؛ لیود (۲۰۰۳)
مس	ترسیب خارج و داخل یاخته‌ای	*انتروباکتر*، *ساکارومایسس سرویزیه*	لیو و همکاران، (۲۰۰۷)؛ کالوتا و همکاران، (۱۹۹۴)
جیوه	تبخیر	*کلاستریدیوم گلیکولیکوم*[6] ASI-1،	مِیر و همکاران، (۲۰۰۷)
منگنز	اکسایش	*پروتئوباکتریا* SD-21	فرانسیس و همکاران، (۲۰۰۱)
سرب	سورفکتنت زیستی، ترسیب خارج یاخته‌ای	*سودوموناس آئروجینوزا* BS2، *انتروباکتر* J1	جووارکار و همکاران، (۲۰۰۷)؛ لیو و همکاران، (۲۰۰۷)

1. *Lactobacillus*
2. *Thermomonaspora* sp.
3. *Gloeothece magna*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Fusarium oxysporum*
6. *Clostridium glycolicum*

ادامه جدول ۱۱-۳ ساز و کارهای مقاومت به فلز میکروبی

فلز	ساز و کار مقاومت	ریزجاندار	مثال‌ها
سلنیوم	کاهش	*دسولفومیکروبیوم نوروژیکوم*[1]، *سودوموناس استوتزری*[2]	هوکین وگاد (۲۰۰۳)؛ لورتی و همکاران، (۱۹۹۲)
اورانیوم	ترسیب خارج یاخته‌ای	*باسیلوس اسفاریکوس*[3] JG-A12	پُل‌من و همکاران، (۲۰۰۶)
روی	انتشار به خارج	*رالستونیا یوتروفا* CH34	نیس (۲۰۰۳)

۱۱-۶-۱- سازوکارهای کمپلکس/ رسوب

اگزوپلیمرها، مانند اگزوپلی‌ساکاریدها (EPS)، و دیواره‌های یاخته‌ای متشکل از لیپوپلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها با گروه‌های عاملی گوناگون هستند که مکان‌های جذبی برای پیوند فلز و ناپویاسازی فلز ایجاد می‌کنند. اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری *پاینی‌باسیلوس جامیلای*[4] تا mg ۲۳۰ سرب در هر گرم EPS را کمپلکس می‌کند (موریلو و همکاران، ۲۰۰۶). به همین ترتیب، EPS سیانوباکتری *نوستوک اِسپانجی‌فُرم*[5] یک جاذب بسیار کارا برای روی است (سینگ و همکاران، ۲۰۰۳). به طور کلی زیست‌توده‌ی میکروبی زنده یا مرده می‌تواند برای جذب فلزها استفاده شود. به عنوان مثال، در پژوهشی که توسط محمد (۲۰۰۱) انجام شد مشخص شد که توده مرطوب و خشک سیانوباکتری *گلئوتک مَگنا* قادر به برقرای پیوند با کادمیوم (۴۳-۳۸ درصد) و منگنز (۴۷-۱۸ درصد) بود. مشخص شد که اکتینومایستی از جنس *استرپتومایسس*، بسیار مقاوم به کرومات است و ۹۴/۷ درصد کروم را در دیواره یاخته انباشته می‌کند که به نظر می‌رسد این انباشت به دلیل کاهش CrO_4^{2-} به Cr^{3+} است (آموروزو و همکاران، ۲۰۰۱). بسته به نوع خاک، pH، نوع فلز، ویژگی‌های سطحی ریزجاندار، و دیگر عوامل محیطی، مقادیر جذب برای فلزهای مختلف متفاوت خواهند بود.

کاهش (احیای) فلز مانند کاهش Cr^{6+} به Cr^{3+} (مَک‌لین و بِوریج، ۲۰۰۱)، و کاهش U^{6+} به U^{4+} (فینرِن و همکاران، ۲۰۰۲) می‌تواند سبب کاهش پویایی و یا سمیت فلز شود. باکتری‌های بی‌هوازی کاهنده سولفات و کاهنده فلز می‌توانند گونه‌های فلزی کم محلول‌تر مانند سولفیدها و

1. *Desulfomicrobium norvegicum*
2. *stuzeri*
3. *Sphaericus*
4. *Jamilae*
5. *Nostoc spongiaeforme*

فسفات‌های فلزی (CdS و PbS)، فلزهای عنصری (Hg^0 و Se^0)، و فلزهای کاهش یافته تولید کنند که در زیســت‌پالایی مفید اســت. به عنوان مثال، Hg^{2+} و نمک‌های جیوه می‌توانند توســط اُپرون مقـاومـت به جیوه‌ای (mer) که به خوبی مطالعه شـــده به جیوه عنصـــری که هم در باکتری‌های گرم-مثبت و هم در باکتری‌های گرم-منفی یافت می‌شـود، کاهش یابند (نیس، ۱۹۹۹). یک بررسی کلی از کاهش میکروبی غیرجذبی فلز توسـط لوید (۲۰۰۳) ارائه شـده است. در پژوهشی که توسط هُکین و گَد (۲۰۰۳) انجام شـــد باکتری کاهنده ســـولفات *دِســـولفومیکروبیوم نُروژیکوم* ۳۵ mg/l سـلنیت سـدیم ($NaSeO_3$) را با سـولفید تولید شده باکتریایی رسوب داده و از محلول حذف کرد. باکتری *اسـیدیتیوباسـیلوس فرواکسیدانس*[1] در حضور بیش از ۲۵ g/L مس، پلی‌فسفات یاخته‌ای را برای برقرای پیوند با مس و انتقال کمپلکس فســـفات- فلز به بیرون یاخته اســـتفاده کرد (آلوارز و جِرز، ۲۰۰۴).

انباشـــت درون یاخته‌ای فلزها می‌تواند با کمپلکس متالوتیونین رخ دهد. متالوتیونین‌ها (MT) و پروتئین‌های مرتبط با آن‌ها غنی از سـیستئین بوده و وزن مولکولی پایینی (محدوده ۶۰۰۰ kDa تا ۱۰۰۰۰) دارند. این پروتئین‌ها در پیوند فلزی درگیر هســتند و در پاسـخ به سـمیت فلزی توسـط یاخته‌های حیوانی، گیاهی و میکروبی تولید می‌شـوند. کالوتا و همکاران (۲۰۰۴) در پژوهشی جدید پروتئین‌های مرتبط با MT را در باکتری‌ها شـناسـایی کرده‌اند که به طور واضـح در مخمر مطالعه شـــده بود. فیگوریـا و همکـاران (۲۰۰۵) افزایش در غلظـت گلوتاتیون[2] (GSH)، که یک پروتئین مرتبط با MT است را در باکتری *رایزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیا*[3] در پاسخ به مواجه با کادمیوم گزارش کردند. بیش از ۷۵ درصـد از کادمیوم به وسـیله گلوتاتیون در *رایزوبیوم لگومینوزاروم* مقاوم به کادمیوم کمپلکس شد. در حالی‌که تنها ۲۳ درصد آن در سویه حساس به کادمیوم کمپلکس شد (لیما و همکاران، ۲۰۰۶).

۱۱-۶-۲- سازوکارهای حلالیت فلز

برخلاف ناپویا شـدن، پویایی فلز از طریق فرایندهایی که نتیجه آن تولید اسـیدهای آلی یا H_2SO_4 اسـت رخ می‌دهد. در نتیجه‌ی رشد، بیشتر ریزجانداران H^+ را در پیرامون خود رها می‌کنند که pH محیط را پایین می‌آورد. افزون بر این، اسـیدهای آلی تولید شـده در تجزیه سوبستراهای آلی مانند، قندها، ســـلولز و غیره، در خاک‌ها pH را پایین آورده و فلزها را کمپلکس می‌کنند. به عنوان مثال، اسـیدهای سـیتریک و اُگزالیک می‌توانند کمپلکس‌های فلزی محلول با Fe، Al و Zn تشکیل دهند

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*
2. Glutathione
3. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

(اِستراسر و همکاران، ۱۹۹۴؛ فرانز و همکاران، ۱۹۹۳). از این توانایی برخی از ریزجانداران به طور گسترده‌ای در آب‌شویی زیستی[1] استفاده می‌شود. آب‌شویی زیستی به طور کلی شامل اکسایش آهن (یعنی، Fe^{2+} به Fe^{3+}) یا کانی‌های دارای گوگرد (یعنی، S^{2-} به SO_4^{2-}) برای تولید اسید سولفوریک است. در نتیجه pH اسیدی ایجاد شده فلزهایی مانند مس و روی را حل کرده و آن‌ها را برای بازیافت قابل دسترس می‌کند. ریزجانداران درگیر در فرایندهای آب‌شویی زیستی هم مقاوم به فلز و هم مقاوم به اسید هستند. از باکتری‌هایی مانند *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* و *لپتوسپیریلوم فرواکسیدانس*[2] عموماً در آب‌شویی زیستی استفاده می‌شود (واتلینگ، ۲۰۰۸).

سیدروفورها نیز با دارا بودن گروه‌های عاملی مانند هیدروکسامات‌ها و کاتکولات‌ها می‌توانند در پویا کردن کمپلکس‌های فلزی نقش داشته باشند (نایر و همکاران، ۲۰۰۷). اگرچه آن‌ها برای دریافت آهن در موجودات اختصاصی هستند، اما برای طیفی از فلزها که می‌توانند به آن‌ها متصل شوند غیر اختصاصی عمل می‌کنند. دیده شده که سیدروفورها علاوه بر آهن (نایر و همکاران، ۲۰۰۷)، می‌توانند با Al، As، Cd، Co، Cr، Cu، Mn، Ni، Pb، Sn و Zn هم پیوند برقرارکنند و سبب افزایش واجذب آن‌ها از ذرات خاک شوند (نئوبائر و همکاران، ۲۰۰۰). سیدروفور پیریدین- ۲، ۶- بیس (تری‌کربوکسیلیک اسید)[3] که توسط سویه KC *سودوموناس استوتزری* تولید می‌شود، As، Cd، Hg و Pb را رسوب داده و باکتری را به این فلزها مقاوم می‌کند (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۷). به همین ترتیب، سورفکتنت‌های زیستی تولید شده میکروبی شامل رامنولیپید توسط *سودوموناس آئروجینوزا*، سورفاکتین توسط *باسیلوس سابتیلیس*، و سوفورولیپید از مخمر *تورولوپسیس بُمبی‌کولا* در مقاومت به فلز نقش داشته‌اند (مولیگان و همکاران، ۲۰۰۱؛ ساندرین و همکاران، ۲۰۰۰). در حالی‌که مشخص شده که سورفکتنت‌های زیستی با انواع فلزها از جمله سرب و روی پیوند برقرار می‌کنند (مایر و سُبرُن- چاوز، ۲۰۰۰)، اما به طور اختصاصی ارتباط تولید سورفکتنت در پاسخ به سمیت فلزی روشن نیست. با این حال، ریزجانداران تولید کننده سورفکتنت زیستی می‌توانند با تنوع بیشتری از خاک‌های آلوده به فلز نسبت به خاک‌های غیرآلوده جدا شوند. البته به این نکته هم باید توجه داشت که بسیاری از این خاک‌ها هم‌زمان با ترکیب‌های آلی نیز آلوده می‌شوند (بودُر و همکاران، ۲۰۰۳).

این مسئله مهم است که اگرچه سیدروفور و کمپلکس‌های فلز- سورفکتنت کمتر سمی هستند، اما کمپلکس شدن فلز با سورفکتنت زیستی می‌تواند حلالیت آن را افزایش دهد. در نتیجه استفاده از این ریزجانداران در پالایش فلزی کاربرد محدودی داشته و در فن‌آوری‌های شستشوی خاک

---

1. Bioleaching
2. *Leptospirillum ferrooxidans*
3. pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid)

پیشنهاد شده‌اند. متیل‌دار کردن زیستی[1] یک پدیده گسترده در میان ریزجانداران برای فلزهایی مانند As، Hg، Se، Sn، Te و Pb است (گَد، ۲۰۰۴). متیل‌دار کردن فلزها توسط باکتری‌ها شامل دگرگونی یک فلز به حالت گازی از طریق افزودن گروه‌های متیل است که سبب افزایش سمیت آن به دلیل ماهیت چربی‌دوستی می‌شود. برای نمونه متیل جیوه ۱۰۰-۱۰ برابر بیشتر از شکل‌های معدنی جیوه سمیت دارد. باکتری‌های کاهنده سولفات زمانی که در معرض سوبسترای HgS قرار گیرند، به طور طبیعی جیوه را متیله می‌کنند (بارکی و همکاران، ۲۰۰۳؛ کینگ و همکاران، ۲۰۰۰؛ کامپو و برتا، ۱۹۸۵). در سوی دیگر ماهیت فرار (گازی بودن) فلزها سبب دور شدن آن‌ها از یاخته باکتریایی به روش انتشار شده و سبب سمیت کمتر محیط برای باکتری می‌شود. تبخیر در مقیاس وسیع می‌تواند سبب کاهش غلظت فلز شود. پالایش خاک‌های با مقادیر بالای سلنیوم در دره سن هواکین[2] کالیفرنیا، زمانی‌که خاک‌ها با منابع کربنی ساده تجزیه‌شونده مانند کود دامی و کازئین اصلاح شده بودند، اتفاق افتاد. افزودن کربن تبخیر باکتریایی سلنیوم را تحریک کرده و تقریباً ۸۸-۶۸ درصد از کل سلنیوم در ۱۵ cm خاک حذف شد (فلاری و همکاران، ۱۹۹۷). دیگر فلزهای متیله شده باکتریایی در خاک شامل Se، Sn، As و Pb هستند (مِیر و همکاران، ۲۰۰۷). تایر (۲۰۰۲) بررسی جامعی درباره‌ی متیله کردن فلزها و متالوئیدها انجام داده است.

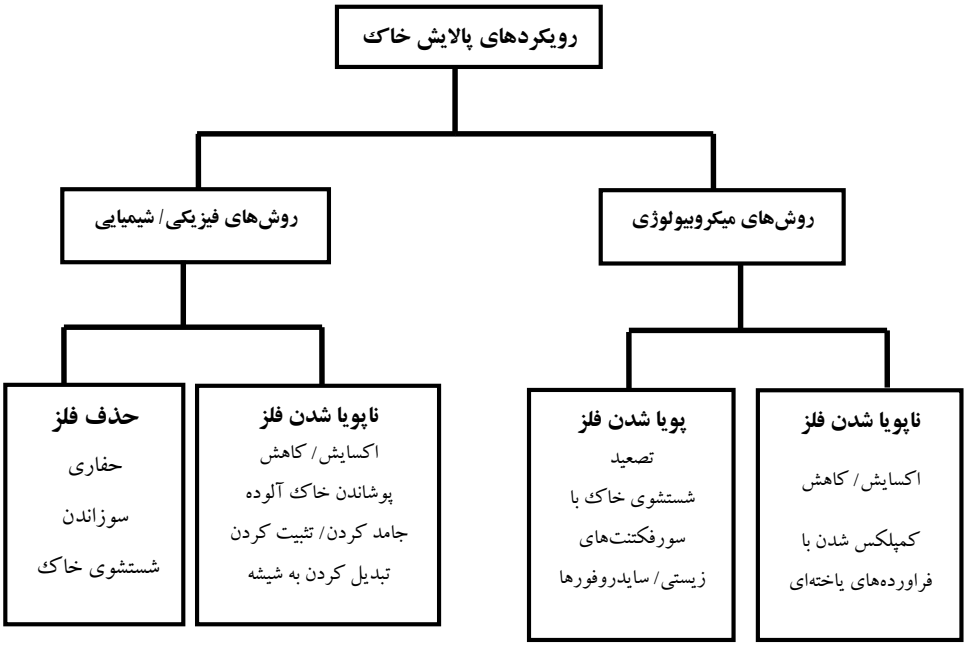
سامانه‌های بیرون ریختن فلزی توسط شماری از ریزجانداران برای حذف فعالانه فلزهای درون یاخته‌ای به کار گرفته می‌شود. این سامانه‌ها از ATP آز یا پمپ‌های یون/پروتون کمواسمزی استفاده می‌کنند. بیرون ریختن آرسنیت توسط ناقل Ars/B به دنبال کاهش آنزیمی آرسنات (AsO_4^{3-}) به آرسنیت (As^{3+}) توسط آنزیم آرسنات ریداکتاز ArsC انجام می‌شود (موکوپادیا و همکاران، ۲۰۰۲). جالب این‌جا است که آرسنیت هنوز هم برای یاخته سمی است. کادمیوم نیز می‌تواند توسط پمپ‌های CadA یا ZntA در *باسیلوس سابتیلیس* و *سودوموناس پوتیدا*[3] فعالانه به بیرون از یاخته منتقل شود (سیلور و فانگ، ۲۰۰۵). این پمپ‌ها می‌توانند غیراختصاصی باشند و دیگر فلزها مانند Pb یا Zn را به بیرون یاخته پمپ کنند. به عنوان نمونه سامانه Czc در انتقال فعال Cd، Co و Zn از سیتوپلاسم *کوپریاویدوس متالیدورانس*[4] CH34 به بیرون یاخته نقش دارد (نیس، ۲۰۰۳). اگرچه انتقال فعال، غلظت فلز در درون یاخته را پایین نگه می‌دارد و برای یاخته‌ها به صورت انفرادی مفید است، اما از این ساز و کار عموماً برای هدف‌های پالایشی استفاده نمی‌شود. زیرا توانایی آن برای سمیت‌زدایی و ناپویا کردن فلز محدود است.

---

1. Biomethylation
2. San Joaquin Valley
3. *putida*
4. *Cupriavidus metallidurans*

۱۱-۷- روش‌های پالایش مبتنی بر میکروب در خاک‌های آلوده به فلز

اولین هدف پالایش فلزی خاک حذف فلز از خاک یا کاهش پویایی فلز و سمیت آن درون خاک است. واکنش‌های متعددی با وساطت میکروبی، از جمله متیله کردن فلز، واکنش‌های اکسایش-کاهش و کمپلکس فلز می‌توانند به این هدف‌ها دست یابند (شکل ۱۱-۱). ماهیت متنوع فعالیت‌های متابولیکی میکروبی به مدت طولانی برای هدف‌های بشر مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال استخراج فلزهای گرانبها از سنگ‌های معدن در آب‌شویی زیستی یکی از آن‌ها است. درک روابط میکروب- فلز سبب پیشرفت‌هایی در زیست‌پالایی شده است (مالیک، ۲۰۰۴؛ بروینز و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل ۱۱-۱ خلاصه‌ای از روش‌های مرسوم و مبتنی بر میکروبیولوژی در پالایش فلزی خاک

۱۱-۷-۱- استفاده غیرمستقیم از فعالیت‌های میکروبی

با تغییر شرایط خاک می‌توان دگرگونی‌های میکروبی فلزها را تقویت کرد. همان‌طور که در بخش ۱۱-۳ بحث شد، برهم‌کنش فلزها در خاک، پویا و حساس به تغییرات محیطی هستند. به عنوان مثال، افزودن مواد آلی حلالیت فلز را کاهش خواهد داد و سمیت را کم می‌کند. اکسایش غیرزیستی

اولیه Fe^{2+} اسیدیته را افزایش می‌دهد و پس از آن تولید اسید میکروبی را تقویت می‌کند و خودش زیســـت‌فراهمی فلز را افزایش می‌دهـد. همین‌طور تغییر پـارامترهـای فیزیکی و شـــیمیایی خاک مسـتقیماً بر فعالیت جوامع میکروبی بومی خاک تاثیر خواهد گذاشـت. اشـباع خاک با ایجاد شرایط کاهشـی، رشـد باکتری‌های کاهنده سـولفات و تشـکیل سولفیدهای فلزی را تسهیل خواهد کرد. با اصـلاح شـرایط خاک، به چنین زیسـت‌پالایی اولیه‌ی تسـهیل شده فلزها در خاک‌ها می‌توان دست یافت. اما با توجه به این‌که تغییرات زیسـت محیطی موقت و ناپایدار هسـتند ممکن اسـت عمر این گونه پالایش‌ها کوتاه باشد.

۱۱-۷-۲- تقویت با ریزجانداران

هدف از تقویت زیسـتی که شـامل اضـافه کردن جمعیت‌های میکروبی ویژه‌ی دگرگون کننده‌ی فلز می‌باشـد، بالا بردن توانایی زیسـتی یک سـامانه اسـت. در حالی‌که فعالیت‌های میکروبی مختلفی را می‌توان به یک سـامانه وارد کرد، تقویت زیسـتی اغلب شـامل وارد کردن جمعیت ناپویا کننده فلز مانند باکتری‌های تولید کننده اگزوپلی‌مر و کاهنده فلزها برای پایدار کردن حرکت و فراهمی فلز در یـک خـاک اسـت. کـاربرد جـدید و جالب‌توجه تقویت زیسـتی و ریزجانداران کاهنده فلز، تلفیق نانوفنّآوری و زیسـت‌پالایی اسـت. ریزجانداران زیادی قادر به تولید نانو ذرات معدنی از فلز محلول موجود در محیط هسـتند (راجندران و گوناسـکاران، ۲۰۰۷). مشـخص شـده اسـت که باکتری‌ها و قـارچهـا نانوذرات نقره (نایر و پرادیپ، ۲۰۰۲)، طلا (احمد و همکاران، a وb ۲۰۰۳؛ نایر و پرادیپ، ۲۰۰۲)، و کادمیوم (احمد و همکاران، ۲۰۰۲) تولید می‌کنند. اکتینومایست *رودوکوکوس* ذرات طلا را نزدیک غشـای سـیتوپلاسـمی و دیواره یاخته‌ای بدون مشـاهده هیچ پیامد سـمی جمع می‌کند (احمد و همکاران، a ۲۰۰۳). گونه‌های *لاکتوباسـیلوس* دانه‌های طلا و نقره درون یاخته‌ای را بدون پیـامـد تولیـد می‌کننـد (نـایر و پردیـپ، ۲۰۰۲). تولیـد نـانوذرات برون یـاختـه‌ای بـا قـارچهـا و اکتینومایسـت‌ها گزارش شـده اسـت (احمد و همکاران، ۲۰۰۲؛ a,b ۲۰۰۳). بازیافت این نانوذرات مورد توجه قرار گرفته است. در حالی‌که تثبیت فلزها در محل می‌تواند برای استفاده در زیست‌پالایی انجام شود.

تقویت زیسـتی چالش‌برانگیز اسـت. زیرا جمعیت‌های میکروبی وارد شده ممکن است نتوانند به اندازه کافی خودشان را در میان جمعیت‌های موجود (بومی) جای دهند تا بتوانند فعالیت مورد نظر را انجام دهند. همچنین جمعیت‌های میکروبی وارد شـده در صورت استقرار نیز ممکن است نتوانند در سـراسـر محیط آلوده پخش شوند و بنابراین توانایی پالایش آن‌ها کم می‌شود. باکستر و کامینگز (۲۰۰۶) نشان دادند که گونه‌های باکتری *رودوکوکوس* می‌توانند خود را در جامعه‌ی میکروبی خاک آلوده به زغال‌سـنگ جای دهند. در پژوهشـی که توسـط روآن و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد سویه

H1 *سودوموناس* که یک باکتری مقاوم به کادمیوم است و *رالستونیا یوتروفا*[1] JMP134 که یک تجزیه‌کننده شناخته شده ۲، ۴-دی (۲، ۴- دی‌کلروفنوکسی استیک اسید) است، همراه با هم به درون یک خاک آلوده به کادمیوم (۶۰ mg/Kg) و ۲، ۴-دی (۵۰۰ mg/Kg) اضافه شدند تا تجزیه ۲، ۴-دی افزایش یابد. *سودوموناس* H1 حلالیت کادمیوم را کاهش داده و اجازه داد که سویه تجزیه‌کننده حساس به کادمیوم بتواند زنده بماند. در طول دوره ۷۰ روز پژوهش، هر دو باکتری به اعضای فعال جامعه میکروبی آن خاک تبدیل شدند. پِپر و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که برای پالایش خاک‌های آلوده‌ی مخلوط به تقویت زیستی نیاز است. در این مورد یک جمعیت باکتریایی برای کاهش سمیت کادمیوم مورد نیاز بود، در حالی‌که گونه دوم باکتری حساس به فلز، ۲، ۴-دی و یا ۳- کلروبنزن را تجزیه می‌کرد.

۱۱-۷-۳- شستشوی خاک با ریزجانداران و فرآورده‌های جانبی آن‌ها

در فرایند خارج از محل، شستشوی خاک با فرآورده‌های میکروبی، وابسته به نتیجه افزایش حلالیت فلز برای تقویت حذف آن است. اخیراً دیده شده که استفاده از سورفکتنت دی- رامنولیپید باکتریایی سبب کاهش تنش فلزی در خاک‌های آلوده به کادمیوم و سرب شده و ۹۲ درصد کادمیوم و ۸۸ درصد سرب را حذف کرد (جیووارکار و همکاران، ۲۰۰۷). ضمن این‌که تنوع میکروبی خاک نیز زمانی‌که فلزها حذف شدند افزایش نشان داد. در پژوهش مولیگان و همکاران (۲۰۰۱)، شستشو تنها با ۰/۵ درصد رامنولیپید، ۶۵ درصد مس و ۱۸ درصد روی را حذف کرد. همچنین شستشو با ۴ درصد سوفورولیپید، ۲۵ درصد مس و ۶۰ درصد روی را حذف کرد و شستشو با ۰/۲۵ درصد سورفاکتین، ۱۵ درصد مس و ۶ درصد روی را از ته‌نشست‌های خاک آلوده حذف کرد. سیدروفور تولید شده توسط *سودوموناس ازتوفورمنس*[2] جدا شده از لجن نفتی قادر بود که بعد از پنج بار شستشو، ۹۲/۸ درصد آرسنیک را از یک خاک آلوده به آرسنیک حذف کند (نایر و همکاران، ۲۰۰۷). نایر و همکاران (۲۰۰۷) همچنین نشان دادند که سیدروفورها می‌توانند فلزها را از سطوح خاک واجذب و به حذف آن‌ها کمک کنند. حلالیت فلز از طریق تولید اسید نیز یک روش عملی در آزادسازی فلزهای متصل به خاک‌ها است. هنگامی‌که یک خاک بیشتر اسیدی می‌شود، فلزهای کاتیونی به طور فزاینده‌ای برای حذف شدن، محلول و قابل دسترس می‌شوند. آب‌شویی زیستی یک نمونه از این نوع فرایند میکروبی است.

---

1. *Eutropha*
2. *Azotoformans*

۱۱-۷-۴- انتقال ژن و مهندسی ژنتیک ژن‌های مقاوم به فلز

ژن‌های مرتبط با ساز و کارهای مقاومت / سمیت‌زدایی فلزی در ریزجانداران به مدت طولانی مطالعه شده‌اند (سیلور و فانگ، ۲۰۰۵). اُپرون cad که در *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول بیرون راندن کادمیوم می‌باشد، به خوبی شناخته شده است (نیس و سیلور، ۱۹۸۹). اُپرون mer که سبب مقاومت به جیوه در تعدادی از ریزجانداران می‌شود نیز به خوبی شناسایی شده است (نیس، ۱۹۹۹). اُپرون czc نیز در باکتری‌های زیادی شناخته شده است (ابوشناب و همکاران، ۲۰۰۷). این گونه ژن‌های مقاوم به فلز به دیگر باکتری‌ها و گیاهان وارد شده‌اند تا به استقرار جمعیت‌های مقاوم فلزی در سامانه‌های آلوده کمک کنند. به عنوان مثال، گونه‌های متعددی از درختان برای تولید گلوتاتیون مرتبط با MT به منظور ترسیب فلز از نظر ژنتیکی تغییر داده شده‌اند (مرکل، ۲۰۰۶).

تقویت زیستی ژنی به صورت فرایند دریافت فعالیت زیستی بهبود یافته پس از انتقال ژن از یک جاندار دهنده ژن وارد شده به سامانه به یک عضو از جمعیت بومی خاک، تعریف می‌شود (مایر، ۲۰۰۰). در یک خاک آلوده به فلز اگر ژن‌های مقاوم به فلز/ سم‌زدایی به جمعیت‌های باکتریایی دریافت کننده ژن[1] داخل خاک منتقل شوند، می‌توان گفت جمعیت بومی خاک فعالیت افزایش یافته سمیت‌زدایی فلز را دریافت کرده است (پِپر و همکاران، ۲۰۰۲). تقویت زیستی ژن ابتدا برای کاهش آلاینده‌های آلی مورد مطالعه قرار گرفته (جسیلا و همکاران، ۲۰۰۷؛ اُرگون- دِمیرتاس و همکاران، ۲۰۰۶) و اگرچه از این روش زیاد استفاده نشده است اما به طور بالقوه می‌تواند جمعیت‌های فراوان با مقاومت به انواع فلزها را در خاک مستقر کند.

۱۱-۷-۵- پیامد میکروبی بر گیاه‌پالایی در رایزوسفر

گیاه‌پالایی که شامل استفاده از گیاهان برای پاک‌سازی مکان‌های آلوده است، روش جذاب دیگری برای پالایش فلزی می‌باشد. ساز و کارها شامل گیاه‌جذبی، تجمع گیاهی[2]، گیاه تثبیتی، و گیاه تصعیدی و پالایش ریشه‌ای[3] است (منوساکی و همکاران، ۲۰۰۸؛ مِندز و مایر، ۲۰۰۸؛ پیلون- اسمیتز، ۲۰۰۵). افزون بر درک این ساز و کارها، پژوهش‌گران همچنین بر روابط بین گیاهان و همزیست‌های میکروبی آن‌ها در رایزوسفر متمرکز شده‌اند. تنوع، تراکم و فعالیت میکروبی در رایزوسفر بیشتر از توده خاک بوده و می‌تواند فعالیت گیاه‌پالایی را ارتقا دهد. ویواس و همکاران (a ۲۰۰۳) نشان دادند که باکتری *بروی‌باسیلوس*[4] قادر به افزایش جذب نیتروژن و فسفر، تشکیل گره،

---

1. Transconjugant
2. Phytoaccumulation
3. Rhizofiltration
4. *Brevibacillus* sp.

رشد گیاه و آلودگی مایکوریزایی شبدر قرمز (*تریفولیوم پراتنس*[1]) در یک خاک آلوده به سرب است. چنین شـرایطی در یک خاک آلوده به کادمیوم نیز دیده شـده اسـت (ویواس و همکاران، ۲۰۰۳b). افزون بر این، مایه‌زنی دوگانه *بروی‌باسیلوس* و قارچ مایکوریزای داخلی (AM) *گلوموس موسـه‌آ*[2] در هر دو مکانی که جذب سـرب و کادمیوم توسـط *تریفولیوم* کاهش یافته بود، نشان دهنده یک ساز و کار محتمل گیاه تثبیتی اسـت که در آن فلز توسـط ریزجانداران و کلات‌کننده فلز ایندول اسـتیک اسـید (IAA) تولید شده توسط *بروی‌باسیلوس* جذب شده است. باکتری *باسیلوس سابتیلیس* سویه SJ-101 نیز قـادر به افزایش جذب نیکل در اندام هوایی گیاه خردل (*براسـیکا جونسـا*[3]) بوده که احتمالاً این کار را از طریق تولید IAA انجام می‌دهد (زایدی و همکاران، ۲۰۰۶). سـیدروفورهای تولید شـده میکروبی نیز با فراهم ساختن بیشتر فلز برای گیاه جذب فلزهای سنگین را افزایش داده و به افزایش گیاه‌جذبی فلز از محیط خاک کمک می‌کنند (نئوبائر و همکاران، ۲۰۰۰).

۱۱-۸- مرزهای جدید در پالایش میکروبی فلز

پالایش زیسـتی سـامانه‌های آلوده به فلز یک زمینه پژوهشی مستمر است. در حالی‌که نیاز است در این زمینه چیزهای بیشـتری روشن شود، زمینه پالایش زیستی فلز در حال برداشت گام‌های بزرگی به سـمت فن‌آوری‌های کاربردی اسـت. بسـیاری از کاربردهای جدید و جالب توجه از ریزجانداران و فرآورده‌هـای آن‌هـا در پـالایش فلزی خاک مطرح شـده‌اند. با افزایش دانش ما از سـاز و کارهای میکروبی متعدد مقاومت به فلز، ممکن اسـت پالایش جایگاه‌هایی با غلظت‌های در حال نوسان فلز و آلاینـده‌هـای آلی و فلزی مختلف امکـان‌پـذیر باشـند. اسـتفاده از فراورده‌های میکروبی و تقویت میکروبی فن‌آوری‌های گیاه‌پالایی در ترکیب با مهندسـی ژنتیک گیاهان و ریزجاندارن برای افزایش جـذب فلز، هـدف‌هـای جـذاب رو بـه بهبود را برای کاربرد ریزجانداران در پالایش فلزی خاک ارائه می‌دهند.

1. *Trifolium pratense*
2. *Glomus mosseae*
3. *Brassica juncea*

منابع

Abou-Shanab RAI, van Berkum P, Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale. Chemosphere 68:360–367.

Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2002) Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, Fusarium oxysporum. J Am Chem Soc 124:12108–12109.

Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Ramani R, Srinivas V, Sastry S (2003a) Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, Rhodocccus species. Nanotechnology 14:824–828.

Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2003b) Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, Thermomonospora sp. Langmuir 19:3550–3553.

Alvarenga P, Palma P, Gonçalves AP, Fernandes RM, de Varennes A, Vallini G, Duarte E, Cunha-Queda AC (2008) Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils. Environ Geochem Health 30:95–99.

Alvarez S, Jerez CA (2004) Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in Acidithiobacillus ferroxidans. Appl Environ Microbiol 70:5177–5182.

Amezcua-Allieri MA, Lead JR, Rodríguez-Vázquez R (2005) Impact of microbial activity on copper, lead and nickel mobilization during the bioremediation of soil PAHs. Chemosphere 61:484–491.

Amoroso MJ, Castro GR, Durán A, Peraud O, Oliver G, Hill RT (2001) Chromium accumulation by two Streptomyces spp. isolated from riverine sediments. J Ind Microbiol Biotechnol 26:210–215.

Bååth E, Díaz-Raviña M, Bakken LR (2005) Microbial biomass, community structure and metal tolerance of a naturally Pb-enriched forest soil. Microb Ecol 50:496–505.

Barkay T, Miller SM, Summers AO (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev 27:355–384.

Baxter J, Cummings SP (2006) The impact of bioaugmentation on metal cyanide degradation and soil bacteria community structure. Biodegradation 17:207–217.

Belyaeva ON, Haynes RJ, Birukova OA (2005) Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. Biol Fertil Soils 41:85–94.

Bodour AA, Drees KP, Maier RM (2003) Distribution of biosurfactant-producting bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl Environ Microbiol 69(6):3280–3287.

Bradl HB (2004) Adsorption of heavy metal ions on soils and soil constituents. J Colloid Interface Sci 277:1–18.

Bragato M, Tenorio JAS (2007) In-situ chemical oxidation of soil contaminated by benzene, lead and cadmium. General Poster Session: The Minerals, Metals and Materials Society Annual Meeting, Orlando FL.

Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 45:198–207.

Carrillo-González R, Sĭmuºnek J, Sauvé S, Adriano D (2006) Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. Adv Agronomy 91:111–178.

Chang S-H, Wang K-S, Kuo C-Y, Chang C-Y, Chou C-T (2005) Remediation of metal-contaminated soil by an integrated soil washing–electrolysis process. Soil Sediment Contam 14:559–569.

Compeau GC, Bartha R (1985) Sulfate-reducing bacteria: principle methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. Appl Environ Microbiol 50:498–502.

Cook SV, Chu A, Goodman RH (2002) Leachability and toxicity of hydrocarbons, metals, and salt contamination from flare pit soil. Water Air Soil Pollut 133:297–314.

Cornu JY, Denaix L, Schneider A, Pellerin S (2007) Temporal evolution of redox processes and free Cd dynamics in a metal-contaminated soil after rewetting. Chemosphere 70:306–314.

Culotta VC, Howard WR, Liu XF (1994) CRS5 encodes a metallothinein-like protein in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 269:25295–25302.

De Mora AP, Ortega-Calvo JJ, Cabrera F, Madejón E (2005) Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. Appl Soil Ecol 28:125–137.

Dick RP (1997) Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, pp 121–156.

Fetzer R, Eskelsen JM, Huston M, Gussman C, Crouse D, Helverson R (2006) Riverbank stabilization of lead contaminated soils using native plant vegetative caps. Soil Sedim Contam 15:217–230.

Figueira EMAP, Lima AIG, Pereira SIA (2005) Cadmium tolerance plasticity in Rhizobium leguminosarum bv. Viciae: glutathione as a detoxifying agent. Can J Microbiol 51:7–14.

Finneran KT, Housewright ME, Lovley DR (2002) Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. Environ Microbiol 4:510–516.

Flury M, Frankenberger WT Jr., Jury WA (1997) Long-term depletion of selenium from Kesterson dewatered sediments. Sci Total Environ 198:259–270.

Francis CA, Co EM, Tebo BM (2001) Enzymatic manganese (II) oxidation by a marine -proteobacterium. Appl Environ Microbiol 67:4024–4029.

Franz A, Burgstaller W, Muller B, Schinner F (1993) Influence of medium components and metabolic inhibitors on citric acid production by Penicillium simplicissimum. J Gen Microbiol 139:2101–2107.

Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122:109–119.

Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309:1387–1390.

Giller KE, Wittwer E, McGrath SP (1999) Assessing risks of heavy metal toxicity in agricultural soils. Human Ecol Risk Assess 5:683–689.

Hayes KF, Traina SJ (1998) Metal ion speciation and its significance in ecosystem health. In: Soil chemistry and ecosystem health, Special publication No. 52. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Hockin SL, Gadd GM (2003) Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 69:7063–7072.

Hong K-J, Tokunaga S, Kajiuchi T (2002) Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. Chemosphere 49:379–387.

Horswell J, Weitz HJ, Percival HJ, Speir TW (2006) Impact of heavy metal amended sewage sludge on forest soils as assessed by bacterial and fungal biosensors. Biol Fertil Soils 42:569–576.

Howe A, Fung LH, Lalor G, Rattray R, Vutchkov M (2005) Elemental composition of Jamaican foods 1: a survey of five food crop categories. Environ Geochem Health 27:19–30.

Jang M, Hwang JS, Choi SI (2007) Sequential soil washing techniques using hydrochloric acid and sodium hydroxide for remediating arsenic-contaminated soils in abandoned iron-ore mines. Chemosphere 66:8–17.

Jarecki MK, Lal R (2005) Soil organic carbon sequestration rates in two long-term no-till experiments in Ohio. Soil Sci 170:280–291.

Jewett SC, Duffy LK (2007) Mercury in fishes of Alaska, with emphasis on subsistence species. Sci Total Environ 387:3–27.

Jou C-JG (2006) An efficient technology to treat heavy metal-lead-contaminated soil by microwave radiation. J Environ Manage 78:1–4.

Jussila MM, Zhao J, Suominen L, Lindström K (2007) TOL plasmid transfer during bacterial conjugation in vitro and rhizoremediation of oil compounds in vivo. Environ Pollut 146:510–524.

Juwarkar AA, Nair A, Dubey KV, Singh SK, Devotta S (2007) Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere 68:1996–2000.

Kassab DM, Roane TM (2006) Differential responses of a mine tailings Pseudomonas isolate to cadmium and lead exposures. Biodegradation 17:379–387.

Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV (2002) Assessing oral bioavailability of metals in soil. Battelle Press, Columbus, OH.

King JK, Kostka JE, Frischer ME, Saunders FM (2000) Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. Appl Environ Microbiol 66:2430–2437.

Kukier U, Chaney RL (2001) Amelioration of nickel phytotoxicity in muck and mineral soils. J Environ Qual 30:1949–1960.

Larner BL, Seen AJ, Palmer AS, Snape I (2007) A study of metal and metalloid contaminant availability in Antarctic marine sediments. Chemosphere 67:1967–1974.

Lima AIG, Corticeiro SC, Figueira EMAP (2006) Glutathione-mediated cadmium sequestration in Rhizobium leguminosarum. Enzyme Microb Technol 39:763–769.

Lloyd JR (2003) Microbial reduction of metals and radionuclides. FEMS Microbiol Rev 27:411–425.

Lortie L, Gould WD, Rajan W, McCready RGL, Cheng K-J (1992) Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a Pseudomonas stutzeri isolate. Appl Environ Microbiol 58:4042–4044.

Lu W-B, Shi J-J, Wang C-H, Chang J-S (2007) Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. J Hazard Mater B134:80–86.

Maier RM (2000) Microorganisms and organic pollutants. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (eds) Environmental microbiology. Academic, San Diego, pp 63–402.

Maier RM, Soberon-Chavez G (2000) Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential environmental applications. Appl Microbiol Biotechnol 54:625–633.

Majewska M, Kurek E, Rogalski J (2007) Microbially mediated cadmium sorption/desorption processes in soil amended with sewage sludge. Chemosphere 67:724–730.

Malik A (2004) Metal bioremediation through growing cells. Environ Int 30:261–278.

Manousaki E, Kadukova J, Papadantonakis N, Kalogerakis N (2008) Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of Tamarix smyrnensis growing on contaminated non-saline and saline soils. Environ Res 106:326–332.

McLaughlin MJ, Hamon RE, McLaren RG, Speir TW, Rogers SL (2000) Review: a bioavailabilitybased rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. Aust J Soil Res 38:1037–1086.

McLean J, Beveridge TJ (2001) Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. Appl Environ Microbiol 67:1076–1084.

Meegoda JN, Kamolpornwijit W, Vaccari DA, Ezeldin AS, Walden L, Ward WA, Noval BA.

Mueller RT, Santora S (1996) Aggregates for construction from vitrified chromium contaminated soils. Engineered contaminated soils and

interaction of soil geomembranes, ASCE Geotechnical Special Publication No. 59.

Meegoda JN, Kamolpornwijit W, Vaccari DA, Ezeldin SS, Noval BA, Mueller RT, Santora S (1999) Remediation of chromium-contaminated soils: bench-scale investigation. Pract Period Hazard Toxic Radioactive Waste Manage 3:124–131.

Mendez MO, Maier RM (2008) Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. Rev Environ Sci Biotechnol 7:47–59.

Merkle SA (2006) Engineering forest trees with heavy metal resistance genes. Silvae Genetica 55:263–268.

Meyer J, Schmidt A, Michalke K, Hensel R (2007) Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. System Appl Microbiol 30:229–238.

Mohamed ZA (2001) Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium Gloeothece magna. Water Res 35:4405–4409.

Moreno JL, Garcia C, Landi L, Falchini L, Pietramellara G, Nannipieri P (2001) The ecological dose (EC50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. Soil Biol Biochem 33:483–489.

Morillo JA, Aguilera M, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sánchez M (2006) Production of a metal-binding exopolysaccharide by Paenibacillus jamilae using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. Curr Microbiol 53:189–193.

Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. FEMS Microbiol Rev 26:311–325.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF (2005) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. J Haz Mat 85:111–125.

Nair A, Juwarkar AA, Singh SK (2007) Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. Water Air Soil Pollut 180:199–212.

Nair B, Pradeep T (2002) Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by Lactobacillus strains. Cryst Growth Des 2:293–298.

Nehdi M, Tariq A (2007) Stabilization of sulphidic mine tailings for prevention of metal release and acid drainage using cementitious materials: a review. J Environ Eng Sci 6:423–436.

Neubauer U, Furrer G, Kayser A, Schulin R (2000) Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. Int J Phytorem 2:353–368.

Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol 51:730–750.

Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy-metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev 27:313–339.

Nies DH, Silver S (1989) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in Alcaligenes eutrophus. J Bacteriol 171:896–900.

Niklin´ska M, Chodak M, Laskowski R (2006) Pollution-induced community tolerance of microorganisms from forest soil organic layers polluted with Zn or Cu. Appl Soil Ecol 32:265–272.

Niu H, Volesky B (2003) Characteristics of anionic metal species biosorption with waste crabshells. Hydrometallurgy 71:209–215.

North American Commission for Environmental Cooperation (2007) Taking stock: 2004 North American pollutant releases and transfers. www.cec.org.

Ouellet S, Bussière B, Mbonimpa M, Benzaazoua M, Aubertin M (2006) Reactivity and mineralogical evolution of an underground mine sulphidic cemented paste backfill. Miner Eng 19:407–419.

Palmroth MRT, Koskinen PEP, Kaksonen AH, Münster U, Pichtel J, Puhakka JA (2007) Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. Biodegradation 18:769–782.

Paria S, Yuet PK (2006) Solidification-stabilization of organic and inorganic contaminants using Portland cement: a literature review. Environ Rev 14:217–255.

Patel PC, Goulhen F, Boothman C, Gault AG, Charnock JM, Kalia K, Lloyd JR (2007) Arsenate detoxification in a Pseudomanoad hypertolerant to arsenic. Arch Microbiol 187:171–183.

Pepper IL, Gentry TJ, Newby DT, Roane TM, Josephson KL (2002) The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. Environ Health Perspect 110:943–946.

Petruzzelli G, Barbafieri M, Bonomo L, Saponaro S, Milani A, Pedron F (2004) Bench scale evaluation of soil washing for heavy metal contaminated soil at a former manufactured gas plant site. Bull Environ Contam Toxicol 73:38–44.

Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. Annu Rev Plant Biol 56:15–39

Pollmann K, Raff J, Merroun M, Fahmy K, Selenska-Pobell S (2006) Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological application. Biotechnol Adv 24:58–68.

Rajendran P, Gunasekaran P (2007) Nanotechnology for bioremediation of heavy metals. In: Singh SN, Tripathi RD (eds) Environmental bioremediation technologies. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 211–222.

Reed BE, Carriere PC, Moore R (1996) Flushing of a Pb(II) contaminated soil using HCl, EDTA, and CaCl2. J Environ Eng 122:48–50.

Renella G, Mench M, Gelsomino A, Landi L, Nannipieri P (2005) Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. Soil Biol Biochem 37:1498–1506.

Renella G, Ortigoza ALR, Landi L, Nannipieri P (2003) Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (EC50). Soil Biol Biochem 35:1203–1210.

Roane TM, Josephson KL, Pepper IL (2001) Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of co-contaminated soil. Appl Environ Microbiol 67:3208–3215.

Roane TM, Pepper IL (2000) Microorganisms and metal pollutants. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (eds) Environmental Microbiology. Academic, San Diego, pp 403–423.

Sandrin TR, Chech AM, Maier RM (2000) A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. Appl Environ Microbiol 66:4585–4588.

Sandrin TR, Maier RM (2002) Effect of pH on cadmium toxicity, speciation, and accumulation during naphthalene biodegradation. Environ Toxicol Chem 21:2075–2079.

Sarrett G, Avoscan L, Carrière M, Collins R, Geoffroy N, Carrot F, Covès J, Gouget B (2005) Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium Ralstonia metallidurans CH34 exposed to selinite and selenate. Appl Environ Microbiol 71:2331–2337.

Scoble M, Klein B, Dunbar WS (2003) Mining waste: transforming mining systems for waste management. Int J Surf Min Reclam Environ 17:123–135.

Shin M, Barrington SF, Marshal WD, Kim J-W (2005) Effect of surfactant alkyl chain length on soil cadmium desorption using surfactant/ligand systems. Chemosphere 58:735–742.

Silver S, Phung LT (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. J Ind Microbiol Biotechnol 32:587–605.

Singh N, Asthana RK, Singh SP (2003) Characterization of an exopolysaccharide mutant of Nostoc spongiaeforme: Zn2+-sorption and uptake. World J Microbiol Biotechnol 19:851–857.

Stefanowicz AM, Niklin´ska M, Laskowski R (2008) Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. Environ Toxicol Chem 27:591–598.

Strasser H, Burgstaller W, Schinner F (1994) High yield production of oxalic acid for metal leaching purposes by Aspergillus niger. FEMS Microbiol Lett 119:365–370.

Thayer JS (2002) Biological methylation of less-studied elements. Appl Organomet Chem 16:677–691.

Urgun-Demirtas M, Stark B, Pagilla K (2006) Use of genetically engineered microorganisms (GEMS) for the bioremediation of contaminants. Crit Rev Biotechnol 26:145–164.

US EPA (2004) Treatment technologies for site cleanup: annual status report (eleventh edition). EPA-542-R-03–009.

Vivas A, Azcón R, Biró B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM (2003a) Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of Trifolium pretense L. under lead toxicity. Can J Microbiol 49:577–588.

Vivas A, Vörös A, Biró B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM, Azcón R (2003b) beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive Glomus mosseae associated with a Cd-adapted strain of Brevibacillus sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. Appl Soil Ecol 24:177–186.

Wang JS, Wai CM (2004) Arsenic in drinking water - a global environmental problem. J Chem Educ 81:207–213.

Watling HR (2008) The bioleaching of nickel-copper sulfides. Hydrometallurgy 91:70–88.

Weber KP, Gehder M, Legge RL (2008) Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure. Water Res 42:180–188.

Weitz HJ, Campbell CD, Killham K (2002) Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. Environ Microbiol 4:422–429.

Yagi K (2007) Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. Appl Microbiol Biotechnol 73:1251–1258.

Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J (2006) Significance of Bacillus subtilis strain SJ-101 as a bioinoculent for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in Brassica juncea. Chemosphere 64:991–997.

Zawadzka AM, Crawford RL, Paszczynski AJ (2007) Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by Pseudomonas stutzeri KC reduces chromium(VI) and precipitates mercury, cadmium, lead and arsenic. BioMetals 20:145–158.

Zhu Y, Zou X, Feng S, Tang H (2006) The effect of grain size on the Cu, Pb, Ni, Cd speciation and distribution in sediments: a case study of Dongpink Lake, China. Environ Geol 50:753–759.

Zoumis T, Schmidt A, Grigorova L, Calmano W (2001) Contaminants in sediments: remobilization and demobilization. Sci Tot Environ 266:195–202.

فصل دوازدهم

دگرگونی فلزها و شبه‌فلزهای سمی توسط *سودوموناس استوتزری* سویه KC و سیدروفور آن پیریدین– ۲، ۶– بیس (اسید تیوکربوکسیلیک)

Anna M. Zawadzka, Andrzej J. Paszczynski,

and Ronald L. Crawford

۱۲-۱- مقدمه

متـابولیســـم میکروبی از راه پاســـخ‌های گوناگون ریزجانداران به کمبود یا بیش‌بود فلز به شـــدت گونه‌بندی فلز در زیســت‌کره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این پاسخ‌ها هم به ویژگی‌های شیمیایی فلز و هم بـه گونه‌های میکروبی بســـتگی دارند. ریزجاندران در طول تاریخ تکاملی خود همواره با فلزها همراه بوده‌اند و فلزها را برای عملکردهای فیزیولوژیکی خود به کار گرفته‌اند. اما از طریق توسعه ساز و کارهای همواستاتیک پیچیده طوری فلز را جذب کرده‌اند که از سمیت آن هم در امان باشند (والز و دِلورنزو، ۲۰۰۲). کاتیون‌های فلزی فعال رداکس (از نظر اکسـایش- کاهش) می‌توانند ساختارهای پیچیده‌ای را با مولکول‌های آلی تشکیل دهند. چنین کمپلکس‌هایی به نوبه خود می‌توانند نقش‌های مهمی را در واکنش‌هـای زیســـت‌شـــیمیـایی ایفـا کننـد. آن‌هـا با فعالیت در مراکز آنزیمی فعال، واکنش‌هـای انتقـال الکترون را تقویـت می‌کننـد. باکتری‌ها به فلزهای اســـتفاده شـــده در چنین کمپلکس‌هایی در مقادیر اندک نیاز دارند. البته آن‌ها اغلب در غلظت‌های بالاتر سمی هستند.

برخی فلزهای سـنگین (مانند، Hg، Cd و Ag) کمپلکس‌های غیراختصـاصـی را درون یاخته‌ها تشـــکیل می‌دهند که ســـبب پیامدهای ســـمی می‌شـــود و بنابراین با عملکردهای فیزیولوژیکی یا مسـیرهای متابولیکی سـازگار نیسـتند. اگر این فلزها از راه سـامانه‌های جذب غیراختصـاصـی وارد یاخته‌ها شـوند نیز ممکن اسـت سـمی باشند. فلزهای سنگین به محض ورود به یاخته، با گروه‌های تیول پیوند برقرار کرده و از این طریق جلوی فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌های ضروری را می‌گیرند. پیوند آن‌ها با گلوتاتیون سبب تنش اکسیدکنندگی می‌شود. برخی از یون‌های فلز سنگین می‌توانند با دیگر کاتیون‌های دو ظرفیتی مهم از نظر فیزیولوژیکی تداخل داشـته باشـند. اُکسی‌آنیون‌های فلز سنگین هم ممکن است در ساز و کار آنیون‌های ساختاری اختلال ایجاد کنند. کاهش این ترکیب‌ها سـبب تشـکیل رادیکال آزاد و جهش‌زایی می‌شـود (نیس، ۱۹۹۹). مقاومت باکتریایی به سمیت فلز سـنگین متداول بوده و به طور کلی شـامل یک یا ترکیبی از سـه سـامانه می‌شود: خارج کردن یون فلزی از یاخته توســط یک ســاز و کار جریان خروجی (انتقال به خارج یاخته)، کاهش فلز به حالت اکسـیداسـیونی با سـمیت کمتر و کمپلکس کردن و جداسـازی فلز از مولکول‌های زیسـتی حساس توسـط مولکول‌های دارای تیول (نیس، ۱۹۹۹). در نتیجه‌ی این برهم‌کنش‌های متفاوت، میکروب‌ها شـیمی فلز را تغییر می‌دهند و اغلب سـبب تغییرهایی در توزیع مکانی فلز، پویایی، و سمیت آن در محیط طبیعی می‌شوند.

ســـیدروفورها کلات‌کننده‌های ویژه آهن هســـتند که ریزجانداران در شـــرایط کم بودنِ آهن به عنوان بخشـی از یک سـامانه هموسـتازی آن را تولید و ترشح می‌کنند (اندروز و همکاران، ۲۰۰۳). برخی از ســـیـدروفورهـا فلزهـایی غیر از آهن را کلات کرده، ترکیـب‌های فلزی محلول و نامحلول

تشـــکیـل داده و بر پویایی و ســـمیت فلزها تأثیر می‌گذارند (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲؛ هیو و بُیر، ۱۹۹۶؛ ویسکا و همکاران، ۱۹۹۲). در برخی موارد، سیدروفورها میکروب‌ها را در مقابل سمیت فلزی حفـاظت می‌کنند (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲؛ فِکِت و بارتون، ۱۹۹۲). ســـیدروفور پیریدین- ۲، ۶- بیس (اسـید تیوکربوکسیلیک)[1] (pdtc)، که توسط *سودوموناس استوتزری* KC، *سودوموناس پوتیدا* DSM 3601، و *سـودوموناس پوتیدا* DSM 3602 تولید می‌شـود فعالیت تجزیه تتراکلرید کربن را به صـورت تصـادفی دارا اسـت (کریدل و همکاران، ۱۹۹۰؛ لی و همکاران، ۱۹۹۹؛ اوکلز و همکاران، ۱۹۷۸). پژوهش‌هـای اخیر نشـــان داده‌اند که تولید pdtc که انتقال آهن به درون یاخته را افزایش می‌دهد (لی‌وایس و همکاران، ۲۰۰۴)، توسط آهن و همچنین روی تنظیم می‌شود (لیچ و همکاران، ۲۰۰۷). یافته‌های جدید نشـان می‌دهند که pdtc ممکن اسـت در دریافت فلزهای انتقالی به غیر از آهن همکاری کند. *سـودوموناس استوتزری* KC، سویه جهش‌یافتهCTN1 آن که pdtc منفی است و دیگر سـویه‌های *سـودوموناس استوتزری* نیز پروفری‌اُکسامین‌ها[2] (pFOs) را تولید می‌کنند که به احتمال زیاد سـیدروفورهای اولیه آن‌ها هسـتند (اِسـن و همکاران، ۲۰۰۷؛ زاوادزکا و همکاران، b ۲۰۰۶). Pdtc یک کلات‌کننده فلزی با طیفی گسترده است و تعداد زیادی از فلزهای انتقالی، برخی از فلزهـای سـنگین، لانتـانیـدها، و اکتینیدها را کلات می‌کند. به طور کلی کمپلکس‌های pdtc با فلزهای کم‌مصـرف محلول هسـتند، در حالی‌که کمپلکس‌ها با فلزهای سـمی رسـوبات نامحلول را تشکیل می‌دهند (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲؛ استول‌وُرسی و همکاران، ۲۰۰۱).

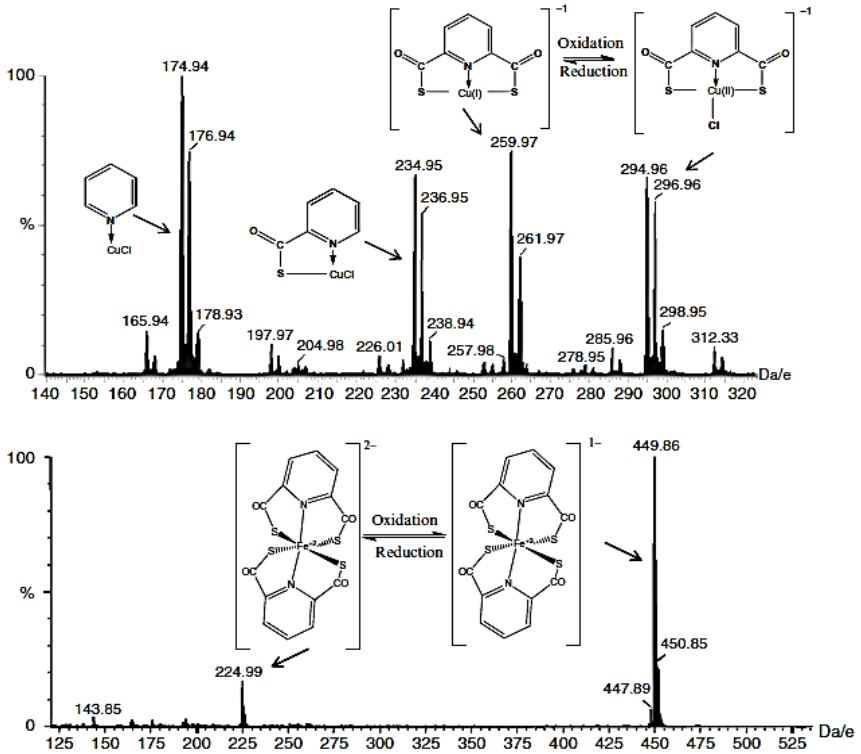
آخرین پژوهش ما نشـان داد که اُکسـی‌آنیون‌های سـلنیوم و تلوریم از جمله متالوئیدهای سمی هسـتند که توسط pdtc و pdtc تولید شده در محیط‌های *سودوموناس استوتزری* KC رسوب داده می‌شوند (زاوادزکا و همکاران، a ۲۰۰۶). همچنین pdtc، کروم (VI) را به کروم (III) کاهش داده و سـپس آن را کلاته می‌کند. محصـولات اکسیداسیون pdtc در نهایت هیدرولیز شده و رسوب کروم که دارای حلالیت پایینی اسـت آزاد می‌شـود (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۷). افزون بر این، پژوهش‌ها درباره ژن‌های درگیر در سـاخت و تنظیم pdtc ، سـبب افزایش دانش ما در زمینه شیمی و ژنتیک pdtc می‌شـــونـد (لیچ و همکاران، ۲۰۰۷؛ لی‌وایس و همکاران، ۲۰۰۴). چون دانش کافی در مورد pdtc داریم و ساخت آن نیز به طور شیمیایی ساده است (هیلدبراند و همکاران، ۱۹۸۳)، می‌توان از آن به عنوان یک نمونه عالی از متابولیت میکروبی مدل در میان سـیدروفورهای باکتریایی اسـتفاده کرد. همچنین ویژگی‌های pdtc، آن را به نمونه مناســـبی برای پالایش فلزهای ســـنگین از طریق کاهش دادن و کمپلکس کردن فلز، رسـوب انتخابی فلزهای سنگین از محلول، و نیز انحلال فلزهای کم‌مصـرف تبدیل می‌کند. Pdtc همچنین دارای توانایی کاربردی در پالایش فلز و ضـایعات مخلوط

1. Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid)
2. Proferrioxamines

آلوده بـه تتراکلرید کربن- فلز اســـت. واکنش pdtc با فلزهای ســـمی و متالوئیدها که کانون توجه پژوهش‌های اخیر هستند در این فصل بررسی می‌شوند.

۱۲-۲- بررسی واکنش Pdtc با فلزها

یکی از سیدروفورهای باکتریایی چندکاره pdtc است. زیرا با تعداد زیادی از فلزها واکنش می‌دهد و کمپلکس آن با مس واکنش و تجزیه بعدی تتراکلرید کربن را افزایش می‌دهد. مشـخص شـده است که pdtc علاوه بر آهن میل ترکیبی به دیگر فلزها نیز دارد. مجموعه‌ای از پژوهش‌ها درباره سـاختار کمپلکس‌هـایی کـه pdtc بـا Fe، Co، Ni و Pd تشـــکیـل می‌دهنـد و ویژگی‌های چرخه رداکس (اکسـایش- کاهش) کمپلکس‌های Fe و Ni آن گزارش شـده است (بُدزیکی‌ویچ، ۱۹۹۳؛ اسپینت و همکـاران، ۱۹۹۴؛ هیلـدبرانـد و همکـاران، ۱۹۸۴؛ هیلدبراند و همکاران، ۱۹۸۵؛ هیلدبراند و لکس، ۱۹۸۹) (شـــکـل ۱۲-۱). pdtc تنها ســـیدروفور شـــناخته شـــده‌ای اســـت که دو اتم گوگرد از تیوکربوکســـیلات و نیتروژن از پیریـدین را برای پیونـد با فلزها اســـتفاده می‌کند. نوی و همکاران (۲۰۰۱) تا کنون تنها یک مورد اســـتثناء را گزارش کردندکه در آن اکســـیژن به جای گوگرد گروه تیوکربوکسـیلات به عنوان لیگاند pdtc برای پیوند UO_2(II) استفاده شد. گوگرد و نیتروژن بازهای لویس نرم هســتند که نسـبت به لیگاندهای اکسـیژن (باز لویس سـخت) تمایل کمتری برای اسـید لویس سـخت Fe(III) دارند که در دیگر سـیدروفورها اسـتفاده شـده اسـت (دانگانا و کروم‌بلیس، ۲۰۰۵). بنابراین به سـبب لیگاندهای پیوندی (اتصـالی)، pdtc به فلزهای لویس نرم مانند کادمیوم، جیوه، طلا، یا مس میل ترکیبی بیشـــتری دارد. به هر حال pdtc میل ترکیبی بالا به فلزهای لویس ســـخت نیز دارد که احتمالاً دلیل آن آرایش اتم‌های لیگاند اســـت که تشـــکیل یک گروه پیوندی سه‌دندانه‌ای را می‌دهند. ثابت‌های پایداری (log K) برای کمپلکس‌های pdtc با Fe(III)، Ni(II) و Co(III) به ترتیب ۳۳/۳۶، ۳۳/۹۳ و ۳۳/۲۸ (اسـتول‌وُرسی و همکاران، ۲۰۰۱) تعیین شده و برای Fe(II) نیز برابر با ۱۲ (براندون و همکاران، ۲۰۰۳) تعیین شده است.



شکل ۱۲-۱ نمونه‌هایی از افشانه الکترونی طیف‌سنجی جرمی (ES-MS) کمپلکس‌های مسطح سه‌دندانه‌ای و کمپلکس‌های اُکتاهدرال شش‌وجهی ایجاد شده توسط پیریدین- ۲، ۶- بیس (اسید تیوکربوکسیلیک) (pdtc). طیف ES-MS از کمپلکس‌های مس: pdtc ۲+ اوج مشخص مربوط به مس و توزیع ایزوتوپ طبیعی کلر را نشان می‌دهد. کمپلکس‌های آهن: pdtc و مس: pdtc می‌توانند چرخه رداکس (اکسایش- کاهش) بین دو حالت اکسایشی متفاوت از فلزها (کوپریک/ کوپروس و فریک/ فروس) را سبب شوند که منجر به تغییر بار کلی کمپلکس (ترکیب) بدون تجزیه آن شود. مشخص شده است که برخی فلزها هیدرولیز pdtc را ارتقا می‌دهند. فرآورده‌های هیدرولیز pdtc هم می‌توانند فلزها را کلات کنند. برای ساختارهای Cr(III): pdtc و کمپلکس فرآورده‌های هیدرولیز pdtc با Cr(III)، شکل ۱۲-۸ را ببینید.

ثابت پایداری موثر (K_{eff}) کمپلکس آهن فریک (سه ظرفیتی):pdtc یکی از بالاترین ثابت‌های پایداری درمیان کلات‌کننده‌های باکتریایی است و حتی از K_{eff} انتروباکتین در pH اسیدی نیز بیشتر است (استول‌وُرسی و همکاران، ۲۰۰۱). کورتز و همکاران (۲۰۰۲) واکنش pdtc با ۱۹ فلز و سه شبه‌فلز و فعالیت‌های زیستیکمپلکس‌های تشکیل شده را مطالعه کردند. مشخص شد که pdtc با ۱۴ فلز کمپلکس تشکیل می‌دهد و کمپلکس‌های آن با سه فلز آهن، کبالت و مس ($Fe:(pdtc)_2$،

$Co:(pdtc)_2$، Cu: pdtc) بین دو حالت اکسایش و کاهش در چرخش هستند. استوکیومتری پیوند فلز با pdtc به ساختار اُربیتالی فلز بستگی دارد. یک مولکول pdtc می‌تواند به یک یون فلزی متصل شده و کمپلکس مسطح سه‌دندانه ایجاد کند، یا دو مولکول pdtc می‌تواند با یک یون فلزی متصل شده و کمپلکس اکتاهدرال شش‌وجهی تشکیل دهد (شکل ۱۲-۱). دیده شده است که برخی از فلزها هیدرولیز pdtc را افزایش می‌دهند که البته فرآورده‌های هیدرولیز pdtc هم می‌تواند آن‌ها را کلات کند (ر.ک: شکل‌های ۱۲-۳، ۱۲-۴ و ۱۲-۸). مشخص شده است که pdtc کمپلکس‌های محلول با تعداد زیادی از فلزها (Au، Bi، Co، Cr، Cu، Fe، Mn، Nd، Ni، Pd و Zn) تشکیل داده اما سبب رسوب فلزهای سنگین سمی و متالوئیدها (As، Cd، Hg، Pb، Se، Sn، Te و Tl) از محلول می‌شود. افزون بر این برخی از گونه‌های باکتریایی در مقابل سمیت Cd، Hg و Te در حضور pdtc حفاظت شدند. همچنین نشان داده شد که pdtc ویژگی ضدمیکروبی دارد که به احتمال زیاد به دلیل ساز و کار ترسیب فلز آن است (سِبات و همکاران، ۲۰۰۱).

۱۲-۳- ماهیت برهم‌کنش Pdtc با فلزهای سنگین و متالوئیدها

مشخص شد که pdtc رسوبات بسیار کم محلولی با جیوه، کادمیوم، سرب و آرسنیک (III) تشکیل می‌دهد که به ترتیب مایل به سفید، سفید، نارنجی و سفید رنگ بودند. به روش طیف‌سنجی جرمی- یونیزاسیون افشانه الکترونی[1] (ESI-MS) مشخص شد که رسوبات کمپلکس‌هایی از فلزها با pdtc هستند. رسوبات تا حدودی در اِن و اِن- دی‌متیل‌فرمامید[2] (DMF) محلول بودند و ما تأیید کردیم که pdtc کمپلکس‌های دارای ساختار مشخص با Cd(II) و Pb(II) ایجاد کرد (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲). پس از افزودن pdtc به مقدار اضافی به محلول جیوه، کمپلکس $Hg(II):(pdtc)_2$ با یک لیگاند گوگردی پروتونه شده، مشاهده شد (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۷). مشخص شد که جیوه سبب هیدرولیز pdtc می‌شود و همچنین کمپلکس جیوه با فرآورده‌های هیدرولیز pdtc مشاهده شدند. ممکن است که کمپلکس Hg(II): (pdtc) نیز مانند دیگر فلزهای دو ظرفیتی تشکیل شود، اما به سبب این‌که کمپلکس در آب یا حلال‌های آلی نامحلول است، توسط ESI-MS قابل تشخیص نیست. کمپلکس pdtc با آرسنیک شناسایی نشد که احتمالاً به سبب حلالیت پایین آن است. رنگ رسوبات به تدریج به رنگ‌های نظیر سولفیدهای فلزی مربوط تغییر کرد، و ترکیب‌های عنصری آن‌ها با آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی- طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس[3] (SEM-EDS) تایید شدند (شکل ۱۲-۲). با توجه به این‌که

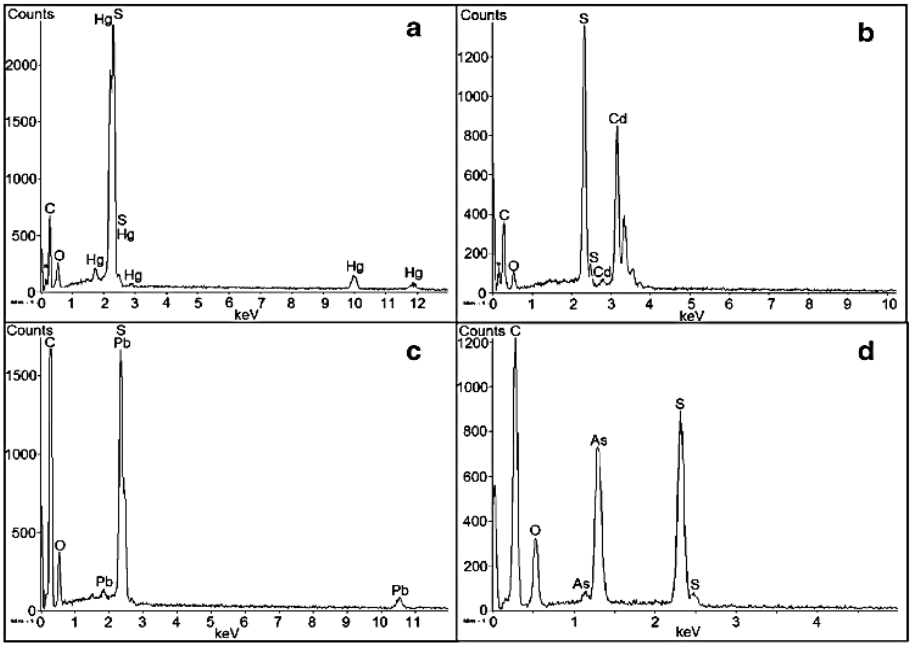
1. Electrospray ionization-mass spectrometry
2. N,N-dimethylformamide
3. Scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry

تمام فلزها با گوگرد همراه شـدند، نتیجه‌گیری کردیم که سولفیدهای HgS، CdS، PbS و As_2S_3 در نتیجه هیدرولیز کمپلکس فلز: pdtc ایجاد شـدند. در مورد As، درصد اتمی آرسنیک و سولفات ۲ به ۳ بود که بیانگر رسـوب As_2S_3 (اُرپیمنت[1]) اسـت که همانند دیگر تری‌سـولفید آرسنیک‌های تشکیل شده با فرایند میکروبی است.البته تری‌سولفید آرسنیک توسط یک ساز و کار متفاوت ایجاد می‌شـود (نیومن و همکاران، ۱۹۹۷). در دیگر رسـوب‌های فلزی، مقدار گوگرد تقریباً دو برابر فلزها بوده که نشـان دهنده احتمال هم‌رسـوبی گوگرد در طی واکنش هیدرولیز کمپلکس که در آن دو لیگـاند گوگردی یـک کـاتیون فلزی را کمپلکس می‌کنند، اسـت. بدین ترتیب نتیجه گرفتیم که کمپلکس‌هایی که pdtc، با Hg، Cd، Pb و As تشکیل می‌دهد مشابه کمپلکس با سایر فلزها است. امـا بـه دلیل حلالیت بسـیار کم کمپلکس این فلزها در آب، رسـوب ایجاد می‌شـود. همچنین کمپلکس‌های فلز سـنگین: pdtc پایداری کمتری از کمپلکس‌های فلزهای انتقالی دارند و بنابراین هیدرولیز شـده و سـولفیدهای فلزی آزاد می‌کنند. در یک مطالعه مرتبط نشـان داده شـد که کمپلکس‌های کادمیوم: تیوکربوکسیلات در دمای پایین‌تر از ۲۵ درجه سلسیوس و در نتیجه تجزیه حرارتی، CdS را آزاد می‌کنند (نیمن و همکاران، ۱۹۹۷).

ترشـح pdtc که سبب اتصال به فلزهای سنگین در کمپلکس‌های نامحلول می‌شود، می‌تواند در ادامه با هیدرولیز این کمپلکس‌ها آزادسـازی سـولفیدهای نامحلول‌تر را نیز افزایش دهد. این مورد می‌تواند به عنوان یک سـاز و کار سـمیت‌زدایی برای *سـودوموناس اسـتوتزری* KC به کار رود. این فرایند فلزها را نامحلول و بنابراین از نظر زیسـتی نافراهم می‌کند (به عنوان مثال، ضـریب حلالیت[2] (K_{sp}) برای سـولفیـد جیوه (HgS) برابر بـا $۶/۳۸ \times ۱۰^{-۲۹}$ و برای سـولفید کادمیوم (CdS) برابر با $۱/۴ \times ۱۰^{-۲۹}$ اسـت). کمترین غلظت‌های بازدارنده[3] (MIC) Pb، Hg و As(III) برای سـویه KC در مقایسـه با pdtc منفی در سـویه جهش یافته CTN1 دو برابر بیشتر بود که تایید می‌کند سویه KC از یک سـاز و کار سم‌زدایی فلز سنگین به واسطه pdtc بهره می‌برد. تنها سمیت کادمیوم برای هر دو سویه یکسان بود. از آن‌جا که فقط سرنوشت کمپلکس‌های pdtc با آهن (لی‌وایس و همکاران، ۲۰۰۴) و روی (لیچ و همکاران، ۲۰۰۷) شـناخته شـده هستند، می‌توانیم حدس بزنیم که برخی از کمپلکس‌های pdtc با دیگر فلزها در مسـیر دریافت عناصـر کم‌مصرف به درون یاخته‌ها انتقال داده می‌شـوند. مقادیر ناچیز کمپلکس کادمیوم محلول ممکن اسـت این مسـیر را دنبال کرده و به جای بازدارندگی رشد سبب سمیت در باکتری شده باشد. کورتز و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که وقتی pdtc به چندین سـویه باکتریایی از جمله *سودموناس استوتزری* KC و CTN1 وارد شد، سویه‌های

1. Orpiment
2. Solubility product
3. Minimum inhibitory concentrations

مزبور از سمیت جیوه و کادمیوم در امان بودند. با وجود این‌که شرایط آزمایشی ما متفاوت بود اما به نظر می‌رسد پیش از این‌که یاخته‌های باکتریایی مایه تلقیح شانس رشد در محیط با محدودیت آهن و دارای کادمیوم را داشته باشند، اثر سمی کادمیوم رخ داده باشد و بنابراین pdtc کافی برای سمیت‌زدایی تولید شود.

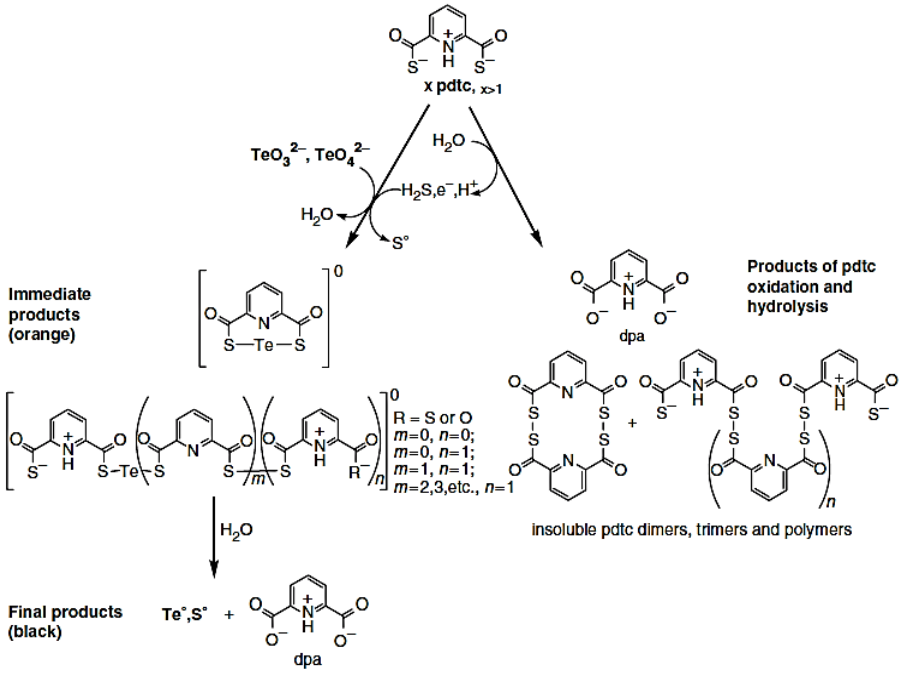


شکل. ۱۲-۲ طیف‌سنجی EDS از رسوب‌های فلز: pdtc. (a) جیوه، (b) کادمیوم، (c) سرب و (d) آرسنیک (III) هستند. شدت پیک با غلظت عنصر در نمونه مرتبط است.

۱۲-۴- کاهش و رسوب اُکسی‌آنیون‌های سلنیوم و تلوریم

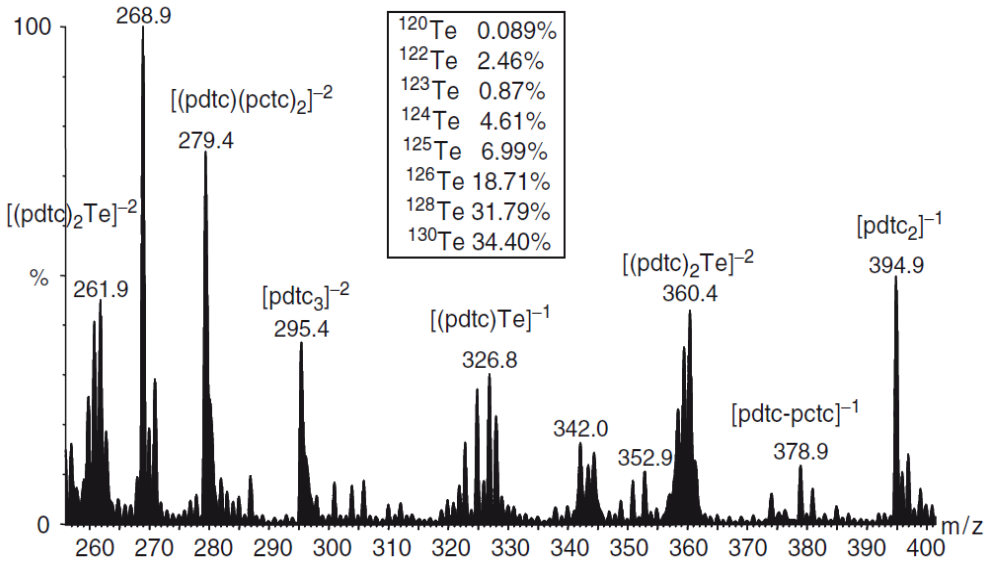
اُکسی‌آنیون‌های سلنیوم و تلوریم از شبه‌فلزهای سمی بودند که توسط pdtc و محیط کشت *سودوموناس استوتزری* KC تولید کننده pdtc رسوب داده شدند و سپس این رسوب‌ها به سلنیوم و تلوریم عنصری تبدیل شدند (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۶a). ساز و کاری را برای سمیت‌زدایی pdtc از تلوریت و سلنیت پیشنهاد کردیم (شکل ۱۲-۳) که مبتنی بر تعیین ساختارهای شیمیایی ترکیب‌های تشکیل شده در طول واکنش‌های اولیه تلوریت و سلنیت با pdtc، با کاربرد طیف‌سنجی جرمی و SEM-EDS بود (شکل‌های ۱۲-۴، ۱۲-۶).

سلنیت و تلوریت توسط pdtc یا فرآورده هیدرولیز آن H_2S کاهش می‌یابند و سلنید: pdtc و تلوریـد: pdtcهـای صـفر ظرفیتی را ایجـاد می‌کنند که در محلول رسـوب می‌کند. سـپس این ترکیب‌های نامحلول هیدرولیز شـده و نانو ذرات سلنیوم و تلوریم عنصری آزاد می‌کنند. آنالیز ESI-MS چندین نوع از تلوریدهای پیریدین- ۲، ۶- بیس (تیوکربوکسـیل)، تلوریدهای دارای دو یا سـه مولکول pdtc، و فراورده هیدرولیز pdtc پیریدین- ۲- کربوکسـیلیک- ۶- اسـید تیوکربوکسیلیک[1] (pctc) را شـناسـایی کرد. همچنین pdtc پلیمریزه شده و مولکول‌های pctc هم دیده شدند (شکل ۱۲-۴).



شکل ۱۲-۳ مسیر پیشنهادی اکسیداسیون غیراختصاصی و هیدرولیز pdtc و واکنش pdtc و فرآورده‌های تجزیـه آن با ترکیب‌های تلوریم. تلوریت و تلورات توسـط pdtc یا فرآورده‌ی هیدرولیز H_2S کاهش داده شـدنـد و سـپس بـه pdtc و فرآورده هیـدرولیز pdtc، شـامل پیریدین- ۲- کربوکسـی- ۶- اسـید تیوکربوکسـیلیک و اسـید دی‌پیکولینیک (dpa) متصـل شدند. تلوریدهای صفر ظرفیتی که ابتدا تشکیل شـدند Te و Se عنصـری آزاد کردند. همه فرآورده‌ها به عنوان مولکول‌های باردار با استفاده از ESI-MS شناسایی شدند و ساختار آن‌ها هم از آنالیزهای شباهت ESI-MS/MS به دست آمد.

1. Pyridine-2-carboxylic-6-thiocarboxylic acid



شـکل ۱۲-۴ طیف ESI-MS که نشان دهنده پیک‌هایی نظیر تلوریدهای pdtc باردار و فرآورده هیدرولیز pdtc و پلیمریزاسـیون آن‌ها اسـت. از فراوانی طبیعی ایزوتوپ‌های تلوریم (در کادر نشان داده شده است) برای حل کردن ساختارهای آنیونی m/z استفاده شدند.

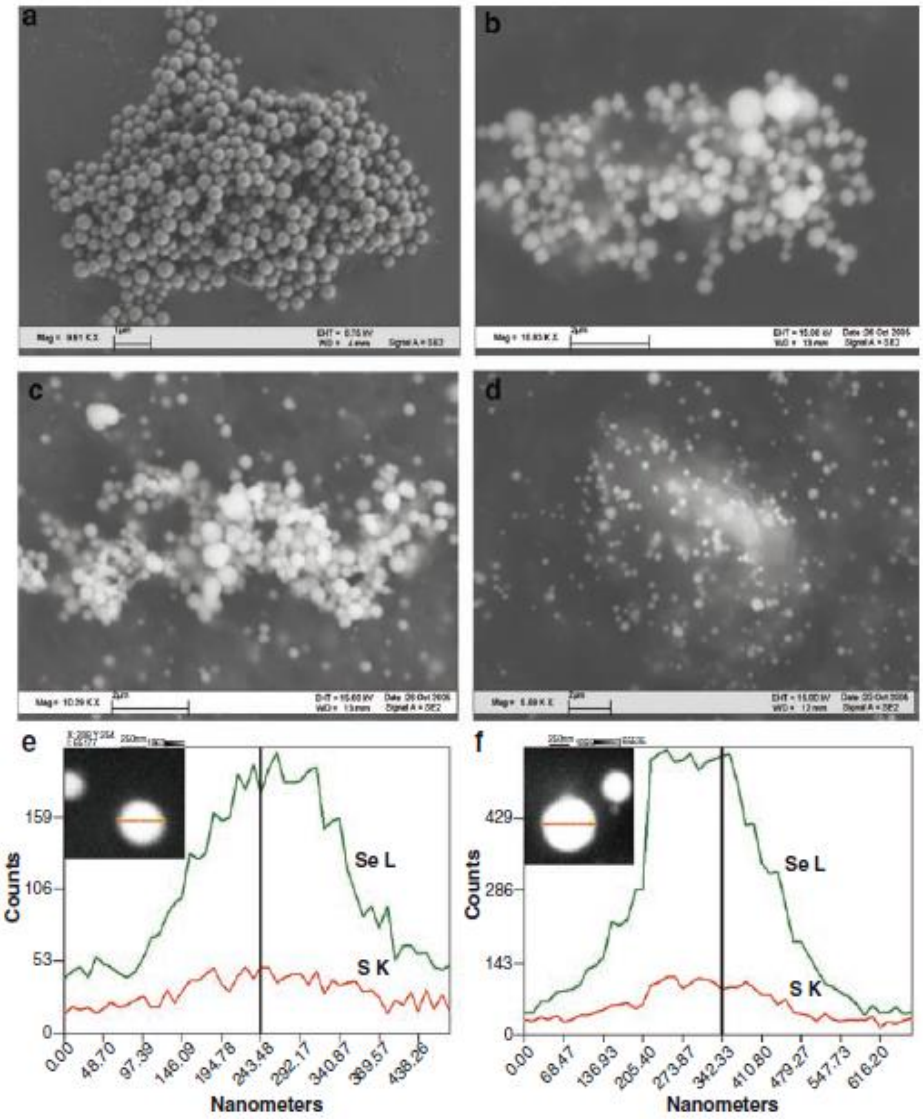
Pdtc از طریق بخش‌های گوگردی خود به اتم‌های تلوریم متصل می‌شود و تلوروتری‌سولفیدهای[1] داخل یا بین‌مولکولی شـبیه به سـلنودی‌گلوتاتیون[2] تشـکیل می‌دهد (کِسـی و هانسـل‌مَن، ۲۰۰۴). H_2S نیز به روش غیرزیسـتی Te(IV) را از طریق سـاز و کاری مشابه باکتری‌های کاهنده سولفات، کاهش می‌دهد (هاکین و گاد، ۲۰۰۳). اگرچه سـلنیدهای pdtc با کاربرد ESI-MS قابل شـناسایی نبودند، اما تغییر رنگ اولیه حاکی از تشـکیل ترکیب‌های سـلنید: pdtc مشـابه با آن‌هایی که برای تلوریم شناسایی شدند، بود. شناسایی pdtc پلیمریزه شده و پیک‌های مولکولی pctc در محلول‌های سلنیت تیمار شده با pdtc پیشنهاد می‌کند که یک ساز و کار یکسان یا مشابه در واکنش سلنیوم با pdtc امکان‌پذیر اسـت. همچنین انتظار داریم که سـلنیوم ویژگی‌های شـیمیایی شبیه به تلوریم را نشـان دهد. زیرا هر دو عنصر به گروه ۱۶ در جدول تناوبی تعلق دارند. در نهایت، هیدرولیز تلوریدها و سلنیدهای pdtc به ترتیب سبب تشکیل تلوریم و سلنیوم سیاه و نارنجی می‌شود که با هم‌رسوبی گوگرد با منشـا سـولفیدهای کربونیل pdtc همراه هستند. واکنش‌ها با وساطت pdtc مشابه واکنش

1. Tellurotrisulfides
2. Selenodiglutathione

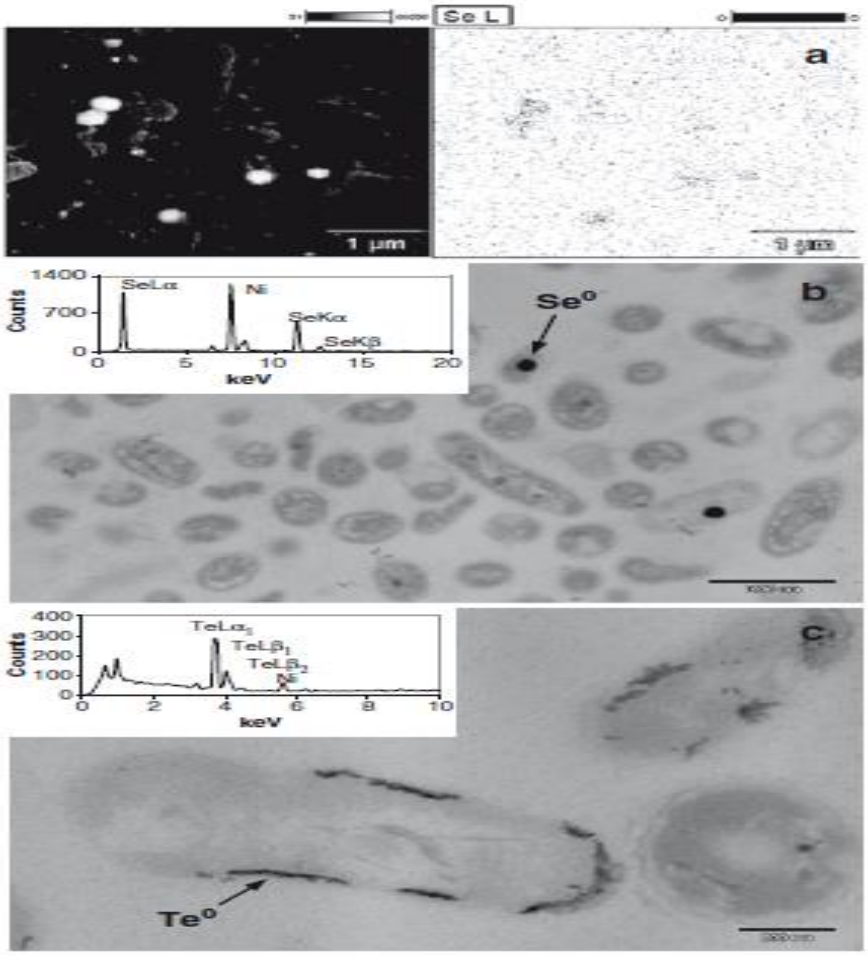
سلنیوم با گلوتاتیون (GSH) در واکنش پینتر[1] خواهد بود (پینتر، ۱۹۴۱). هنگامی‌که نسبت مولی pdtc به سلنیت در محلول ۴ به ۱ بود، حذف کامل سلنیت دیده شد. کاهش غلظت سلنیت با تغییر رنگ رسوب به نارنجی- قرمز (نارنجی مایل به قرمز) همراه شد. هنگامی‌که پروفری‌اُکسامین B همراه با pdtc در محلول حضور داشت، هم‌افزایی بین آن‌ها دیده شد. به طوری که سلنیت به طور کامل در نسبت مولی ۲ به ۱ برای سیدروفور به سلنیت حذف شد.

شکل و ترکیب رسوب‌های شبه‌فلزی که به صورت غیرزیستی با واکنش شیمیایی pdtc با سلنیت و تلوریت ایجاد شدند با استفاده از SEM-EDS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل با نتایج آنالیز رسوب‌های تشکیل شده در محیط کشت‌های باکتریایی *سودوموناس استوتزری* سویه KC و CTN1 و عصاره صاف شده محیط کشت سویه KC مقایسه شدند (شکل ۱۲-۵ و ۱۲-۶). تنها در عصاره صاف شده (بدون یاخته) محیط کشت *سودوموناس استوتزری* KC که دارای pdtc بود، با افزودن سلنیت یا تلوریت به ترتیب رسوب قرمز یا قهوه‌ای تیره ایجاد شد که نشان دهنده کاهش ناشی از pdtc است. شکل و آرایش عنصری این رسوب‌ها بیشتر از آن‌که مشابه کشت‌های باکتریایی سویه CTN1 باشند، شبیه به رسوب‌های ایجاد شده در واکنشی غیرزیستی با pdtc بودند. این وضعیت نشان دهنده آن است که pdtc عامل کاهش برون یاخته‌ای و رسوب این شبه‌فلزها است. واکنش‌پذیری pdtc برای سلنیت سبب ایجاد یک رسوب با ویژگی‌های مشابه با سلنیوم برون یاخته‌ای رسوب داده شده توسط باکتری‌های کاهنده سولفات شد (هاکین و گاد، ۲۰۰۳). حضور گوگرد در رسوب‌های سلنیت و تلوریم ایجاد شده به وسیله pdtc حاکی از درگیری گروه تیول pdtc در کاهش اُکسی‌آنیون شبه‌فلزی است. رسوب عنصری سلنیوم و تلوریم در نتیجه هیدرولیز pdtc و pdtc: سلنید و pdtc: تلورید بود. در مقابل، آنالیز EDS رسوب ایجاد شده سلنیوم و تلوریم درون یاخته‌ای توسط سویه KC و CTN1 حضور مقادیر محسوس گوگرد را نشان ندادند (شکل c، b ۱۲-۶). این امر نشان می‌دهد که ساز و کارهای تشکیل رسوب Se و Te در درون یاخته با فرایندهای تشکیل رسوب برون یاخته‌ای متفاوت است.

1. Painter



شکل ۱۲-۵ تصاویر SEM رسوب‌های سلنیوم ایجاد شده: (a) رسوب در عصاره صاف شده محیط کشت *سودوموناس استوتزری* KC دارای تقریباً ۰/۱ mM pdtc تولید شده توسط باکتری، (b) رسوب غیرزیستی به وسیله pdtc ساخته شده با روش شیمیایی، (c) در کشت باکتریایی *سودوموناس استوتزری* KC و (d) در کشت باکتریایی از *سودوموناس استوتزری* CTN1. اسکن‌های خط EDS از دایره‌های سلنیوم ایجاد شده است: (e) در عصاره صاف شده محیط کشت *سودوموناس استوتزری* CTN1 و (f) رسوب غیرزیستی توسط pdtc ساخته شده شیمیایی (ولتاژ شتاب دهنده= ۱۵ kV)



شکل ۱۲-۶ (a) ریزنگار الکترونی روبشی از یاخته‌های *سودوموناس استوتزری* KC که روی محیطی با مقدار محدود آهن همراه با سلنیت سدیم ۰/۵mM رشد کرده‌اند. تصویر سمت راست سیگنال مربوط به تراکم EDS سلنیوم را نشان می‌دهد که با دانه‌های سفید برون یاخته‌ای که در تصویر سمت چپ دیده می‌شوند در ارتباط است. (b) تصاویر TEM از یاخته‌هایی که در حضور سلنیت mM ۰/۵ رشد داده شدند (*سودوموناس استوتزری* KC) و (c) تلوریت mM ۰/۰۵ (*سودوموناس استوتزری* CTN1). پیکان‌ها رسوب‌های Se^0 و Te^0 را نشان می‌دهند که در ذرات متراکم الکترونی داخل یاخته‌ها انباشته شده‌اند. ترکیب رسوب‌ها به وسیله آنالیز EDS (طیف در بالای عکس نشان داده شده است) تأیید شدند. سیگنال Ni از شبکه نیکلی SEM می‌آید.

آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی و آنالیزهای EDS امکان تعیین موقعیت مکان‌های رسوب سلنیوم و تلوریم عنصری در کشت‌های باکتریایی را فراهم کردند. تصاویر SEM کشت‌های سویه KC به روشنی فراوانی رسوب‌های کروی برون یاخته‌ای سلنیوم را نشان دادند (شکل ۱۲a-۶) که مشابه با آن‌هایی بود که در زیست لایه‌های باکتری‌های کاهنده سولفات (SRB) یافت می‌شود (هاکین و گاد، ۲۰۰۳). آنالیز TEM حضور ذرات سلنیوم متراکم- الکترونی کروی موجود در درون یاخته‌های هر دو سویه KC و CTN1، و رسوب‌های Te^0 در غشای یاخته هر دو سویه را نشان داد (شکل c، b ۱۲-۶). البته رسوب‌های درون یاخته‌ای در سویه CTN1 فراوانی بیشتری داشتند. روشن است که pdtc می‌تواند مقادیر زیادی از سلنیوم را کاهش داده و در بیرون یاخته‌های سویه KC رسوب دهد، اما در این‌جا، محیط کشت استفاده شده به طور کامل از ورود سلنیت به درون یاخته جلوگیری نکرد. با این وجود ما اعتقاد داریم که همان‌طور که کمینه‌ی غلظت بازدارنده (MIC) برای سلنیت در کشت سویه KC در فاز ساکن رشد شش برابر بالاتر است، رسوب برون یاخته‌ای نقش مهمی در جلوگیری از سمیت سلنیت بازی می‌کند. دیدن رسوب‌های تلوریم با SEM: آنالیز EDS سخت‌تر بود که نشان می‌دهد تلوریم همراه با یاخته‌ها یا مواد برون یاخته‌ای است. اگرچه یاخته‌های سویه KC دارای تلوریم رسوب کرده کمتری بود، ولی تولید pdtc از ورود تلوریت به درون یاخته‌ها در شرایط آزمایشی ما جلوگیری نکرد. افزون بر این MIC تلوریت برای سویه KC خیلی بالا نبود (یعنی به اندازه MIC سلنیت نبود) که نشان دهنده پیامد سمی بالاترِ تلوریت و کاهش کارایی سمیت‌زدایی با واسطه pdtc است. همچنین نشان داده شد که تلوریت در حدود ۱۰۰۰ برابر سمی‌تر از سلنیت برای *ای. کولای* است (ترنر و همکاران، ۲۰۰۱). با این حال، قبلاً نشان داده شد که pdtc، چهار سویه باکتریایی دیگر را که pdtc تولید نمی‌کنند، از سمیت Te محافظت می‌کند (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲). این امر بیانگر این است که pdtc زیست‌فراهمی تلوریم را کاهش می‌دهد.

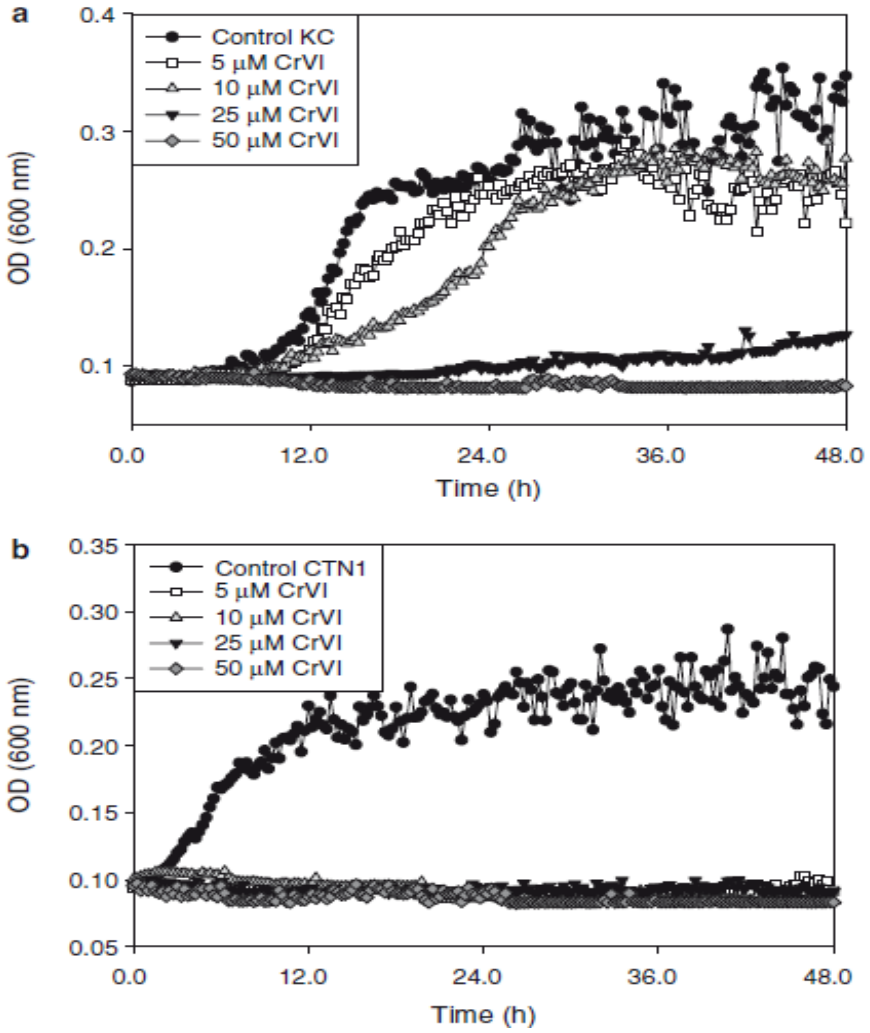
ما نتیجه‌گیری کردیم که علاوه بر سایر عمل‌کردهایی که pdtc دارد، تولید و ترشح آن سبب کاهش شبه‌فلز برون یاخته‌ای می‌شود و به عنوان یک ساز و کار سمیت‌زدایی محیطی برای *سودوموناس استوتزری* KC به کار گرفته می‌شود. ما حذف سلنیت را در واکنش‌های غیرزیستی و همچنین در محیط کشت مصرفی فیلتر شده‌ی سویه KC تولید کننده pdtc مشاهده کردیم، که تأیید می‌کند pdtc سبب کاهش سلنیت سمی و رسوب Se^0 می‌شود. ترکیب و ظاهر رسوب‌های سلنیوم و تلوریم ایجاد شده در محیط کشت *سودوموناس استوتزری* KC و در واکنش‌های غیرزیستیِ pdtc خالص یکسان بودند که نشان می‌دهد تشکیل رسوب در هر دو مسیر یکسان بوده است. Pdtc می‌تواند به عنوان یک عامل بازدارنده در برابر سمیت سلنیت و تلوریت پیش از ورود این اُکسی‌آنیون‌های شبه‌فلزی به درون یاخته‌های باکتریایی مورد توجه قرار گیرد. مولکول‌های

دارای تیول مانند pdtc اگر در محیط ترشح شوند، می‌توانند نقش‌هایی مشابه تیول‌های درون یاخته‌ای را بدون ایجاد تنش اکسیداتیو انجام دهند. بر خلاف بسیاری از ساز و کارهای سمیت‌زدایی کاهنده دیگر، کاهش سلنیت و تلوریت با وساطت pdtc می‌تواند در شرایط هوازی انجام شود.

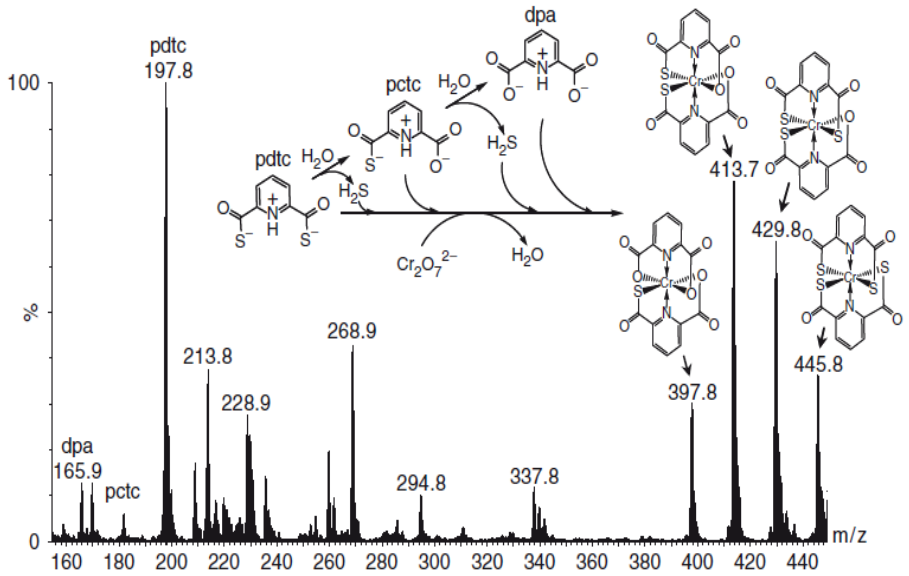
۱۲-۵- کاهش کروم (VI) با وساطت Pdtc

کروم (VI) به شکل کرومات (CrO_4^{2-}) و دی‌کرومات ($Cr_2O_7^{2-}$) شکل غالب کروم در شرایط هوازی است و سمی‌تر و پویاتر از Cr(III) می‌باشد. ارزیابی سمیت کروم (VI) روی *سودوموناس استوتزری* KC و CTN1 نشان داد که Cr(VI) از رشد *سودوموناس استوتزری سویه* KC در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ mM جلوگیری کرده در حالی‌که سویه CTN1، که توانایی ساخت pdtc را ندارد، نتوانست در هیچ غلظتی از دی‌کرومات مورد آزمایش رشد کند (شکل ۱۲-۷) (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۷). افزون بر این دیده شد که غلظت دی‌کرومات در کشت‌های فعال در حال رشد سویه KC کاهش یافت. هر دو سویه سیدروفورهای دس‌فری‌اُکسامین[1] را تولید کردند، اما تنها KC، pdtc را تولید کرد. این مشاهده‌ها بیانگر همبستگی بین تولید pdtc و مقاومت به کروم است. سمیت کروم در *سودوموناس استوتزری* KC سبب طولانی شدن فاز رشد لگاریتمی و کاهش سرعت رشد می‌شود که مشابه پیامدهای سمی کروم روی جلبک‌ها است (سروانتز و همکاران، ۲۰۰۱). هنگامی‌که سویه CTN1 به مدت ۷۲ ساعت در حضور ۱۰ mM Cr(VI) کشت داده شد، رشد همراه با کاهش جزیی در غلظت دی‌کرومات ثبت شد. این نتیجه ممکن است نشان دهنده یک ساز و کار دیگر از مقاومت به کروم مانند فرایند برون‌ریز القایی (آگویلرا و همکاران، ۲۰۰۴) یا واکنش آنزیمی (پارک و همکاران، ۲۰۰۰) باشد. اما این موارد کارآمدی کمتری از فعالیت pdtc دارند.

1. Desferrioxamine



شکل ۱۲-۷ منحنی‌های رشد (a) *سودوموناس استوتزری* KC و (b) CTN1 کشت شده در محیطی با مقدار محدود آهن با Cr(VI) اضافه شده به شکل دی‌کرومات پتاسیم در قالب پلیت میکروتیتر. غلظت ۵ mM Cr(VI) از رشد CTN1 جهش یافته که فاقد مسیر ساخت زیستی pdtc بود، جلوگیری کرد. برای جلوگیری از رشد کامل گونه وحشی (اصلی) KC، غلظت ۵۰ mM از Cr(V) مورد نیاز بود.

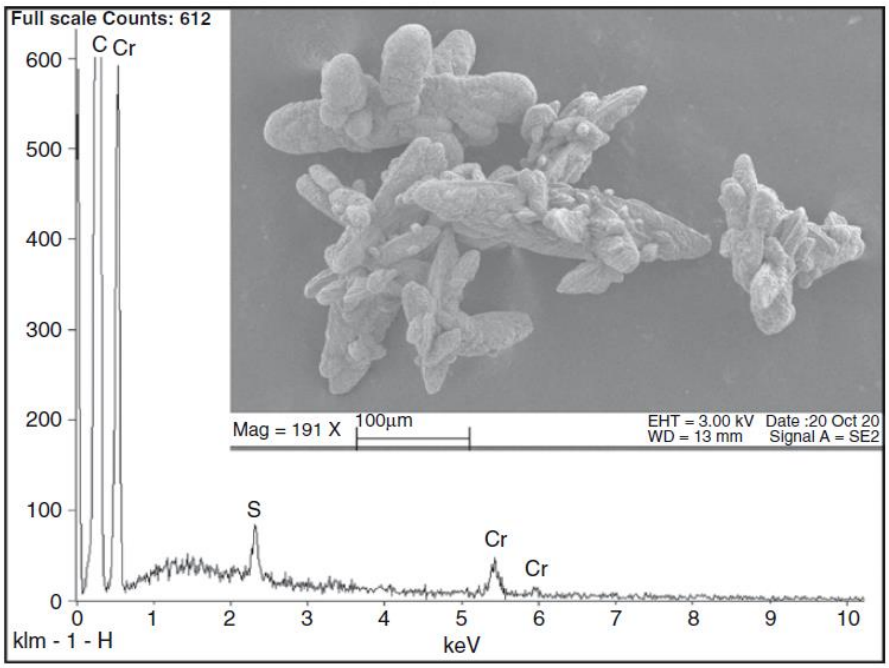


شکل ۱۲-۸ طیف ESI-MS و ساختارهایی از کمپلکس Cr(III) با pdtc و فرآورده‌های هیدرولیز آن که در DMF و با واکنش pdtc با Cr(VI) ایجاد شده‌اند. واکنش‌های ممکنِ Cr(VI) (به عنوان دی‌کرومات) و pdtc که سبب تشکیل کمپلکس‌های $(pdtc)_2$Cr(III): و فرآورده هیدرولیز $(pdtc)_2$: Cr(III)، شامل کمپلکس‌های هیبرید (مخلوط) دارای pdtc، پیریدین- ۲- کربوکسیل- ۶- تیوکربوکسیلیک اسید (pctc) و اسید دی‌پیکولینیک[1] (dpa) می‌شود، به صورت شماتیک نشان داده شده است.

مشخص شد که pdtc، هم در کشت‌های باکتریایی و هم در واکنش‌های غیرزیستی با pdtc ساخته شده به روش شیمیایی، Cr(VI) را به Cr(III) کاهش داد. سپس Cr(III) کمپلکس‌هایی با pdtc و فرآورده‌های هیدرولیز آن ایجاد کرده و حضور آن‌ها با آنالیز ESI-MS تایید شد (شکل ۱۲-۸). ما فرض می‌کنیم که Cr(VI) توسط H_2S آزاد شده از هیدرولیز pdtc، به Cr(III) کاهش می‌یابد که شبیه کاهش کروم با سولفید تولید شده توسط باکتری‌های کاهنده سولفات است (چاردین و همکاران، ۲۰۰۳). کروم کاهش یافته سپس توسط pdtc باقی‌مانده و فرآورده هیدرولیز آن، پیریدین- ۲- تیوکربوکسیلیک- ۶- کربوکسیلیک اسید (pctc) و اسید دی‌پیکولینیک (dpa) کمپلکس می‌شود. حضور کمپلکس‌های Cr(III) و pctc و dpa در محلول شواهدی برای این واکنش‌ها است. این کمپلکس‌ها تا ۹۰ روز نسبتاً پایدار بودند؛ اگرچه غلظت آن‌ها به طور چشم‌گیری با زمان کاهش یافت، که بیانگر هیدرولیز آهسته این کمپلکس‌ها همراه با تشکیل رسوبی سیاه بود

1. Dipicolinic acid

(زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۶a). انتظار می‌رفت که رسوب Cr(III) دارای سولفیدهای کروم (III) یا هیدروکسیدهای کروم (III) باشد (سروانتز و همکاران، ۲۰۰۱؛ ایوانکو و دِزومبِک، ۱۹۹۷). رسوب تشکیل شده در غلظت‌های بالای معرف، برداشته شده و با SEM-EDS آنالیز شد (شکل ۱۲-۹).



شکل ۱۲-۹ طیف EDS از رسوب سیاه (تصویر) در مخلوطی از دی‌کرومات (۱۰ mM) و pdtc (۱۰ mM) ایجاد شده در آب (احتمالاً Cr_2S_3).

آنالیز عنصری وجود کروم و گوگرد را در رسوب سیاه نشان داد که احتمالاً به Cr_2S_3 نامحلول در آب مرتبط است. بنابراین ما نتیجه گرفتیم که کاهش دی‌کرومات توسط pdtc سبب آزادسازی سولفیدها، اکسیدها، و هیدروکسیدهای کروم (III) نامحلول می‌شود. هم‌چنین عصاره‌های صاف شده کشت *سودوموناس استوتزری* KC دارای pdtc تولید شده زیستی در حذف دی‌کرومات به همان اندازه‌ی کشت‌های دارای یاخته مفید بودند. سرانجام واکنش‌های غیرزیستی توسط pdtc ساخته شده به روش شیمیایی نشان داد که pdtc در کاهش دی‌کرومات موثر بوده اما این فرایند در حضور پروفری‌اُکسامین B و فلزهای انتقالی کارآمدتر بود (زاوادزکا و همکاران، ۲۰۰۷). در pH = ۷، pdtc در کاهش Cr(VI) بالاترین کارایی را داشت. البته در این pH، فلزها منجر به تسریع در کاهش دی‌کرومات می‌شوند. این فرایند یک فرایند کاملاً شناخته شده است و در پالایش Cr(VI)

توسط آهن صفر ظرفیتی در محدوده‌های نفوذپذیر استفاده می‌شود (ایوانکو و دِزوم‌بِک، ۱۹۹۷). در pH = ۸، pdtc مخلوط شـده با فلزها به ویژه هنگامی‌که همراه با پروفری‌اُکسامین B بود، در کاهش Cr(VI) از pdtc تنها کارآمدتر بود. این فرایند نمی‌تواند به تنهایی به فلز نسـبت داده شود. زیرا در تیمارهای دارای فلزها بدون سـیدروفورها، سـطح دی‌کرومات ثابت باقی ماند. از آن‌جا که تشـکیل کمپلکس فلز: pdtc را در این شـرایط بـا کـاربرد ESI-MS تـأیید کرده‌ایم، به نظر می‌رسـد که کمپلکس‌های سـیدروفور با فلزها حتی در کاهش Cr(VI) از سولفید هیدروژن مشتق شده از pdtc کارآمدتر بوده‌اند.

۱۲-۶- چشم‌انداز (دیدگاه) بیوتکنولوژی از برهم‌کنش میکروبی با فلزها

فراینـدهـایی کـه بـا وسـاطـت میکروبی بر پویایی فلز تأثیر می‌گذارند توجه بیشـتری را در بین پژوهش‌گران بیوتکنولوژی زیسـت محیطی به خود جلب می‌کنند. متابولسـم میکروبی می‌تواند به طور چشم‌گیری بر گونه‌بندی فلز و به دنبال آن پویایی و سمیت فلز تأثیر گذارد. ماهیت برهم‌کنش بین میکروب و فلز به دسترسی زیستی یون‌های فلزی مهم و نیاز به حفاظت در برابر سمیت مقادیر بیش از حد فلزهای ضـروری و فلزهای سـنگین سـمی بستگی دارد. باکتری‌ها می‌توانند فلزها را به وسـیله آبشـویی، از طریق کمپلکس با سـیدروفور، و از طریق متیله شـدن یا دگرگونی‌های رداکس (اکسـایش- کاهش) پویا کنند. باکتری‌ها همچنین ممکن اسـت فلزها را به وسـیله جذب سـطحی، جذب و ترسـیب، رسوب به شکل ترکیب‌های آلی و معدنی (مانند سولفیدها)، یا فرایندهای رداکس (اکسـایش- کاهش) ناپویا کنند. از دیدگاه زیسـت‌پالایی، حلالیت فلزها ابزاری را برای حذف فلز از پسـماندهای جامد فراهم می‌کند، در حالی‌که ناپویاسـازی فلزها ممکن است برای پالایش خاک‌ها یا ته‌نشـسـت‌ها در محل و همچنین حذف فلز از محلول‌های آبی مفید باشد (گاد، ۲۰۰۴). برای نمونه حلالیـت فلز با واسـطه سـیدروفور در *آلکالیجنز یوتروفوس*[1] برای پالایش خاک‌های آلوده به فلز اسـتفاده شـده اسـت (دیلز وهمکاران، ۱۹۹۹). ریزجانداران از سیدروفورها برای انحلال Fe(III) به منظور جذب آهن اسـتفاده می‌کنند. اما سیدروفورها در بیشتر موارد می‌توانند به دیگر فلزها متصل شـوند و بنابراین به عنوان عوامل حل کننده فلز عمل کنند. به عنوان مثال، سیدروفور پیریدین- ۲، ۶- بیس (اسید تیوکربوکسیلیک) آهن سه ظرفیتی و چندین فلز دیگر را حل می‌کند، اما رسوب‌های نامحلولی هم با تعداد زیادی از فلزهای سـمی و شبه‌فلزها ایجاد می‌کند و می‌تواند بالقوه برای حذف این فلزها از محلول مورد استفاده قرار گیرند (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲).

---

1. *eutrophus*

مثالی دیگر از به کارگیری باکتری‌ها در پالایش آلودگی فلز استفاده از SRB برای رسوب فلز از آب و خاک، و برای کاهش فلز است (دیلز و همکاران، ۲۰۰۲؛ گاد، ۲۰۰۴؛ والز و دِلورنزو، ۲۰۰۲). باکتری‌های کاهنده سولفات، سولفات را به سولفید هیدروژن کاهش می‌دهند و فلزها را به سولفیدهای فلزی نامحلول در شرایط بی‌هوازی دگرگون می‌کنند. این باکتری‌ها همچنین می‌توانند رسوب کاهشی فلزهای سمی و شبه‌فلزهایی مانند U(VI)، Cr(VI)، Tc(VI)، As(V)، Se(IV) و Te(IV) را هم انجام دهند. فرایند کاهش می‌تواند به صورت آنزیمی و توسط سیتوکروم‌ها کاتالیز شود یا می‌تواند به شکل غیرمستقیم توسط آهن دو ظرفیتی یا سولفید تولید شده‌ی زیستی انجام شود. کاهش غیرجذبی فلز در ریزجانداران به عنوان ابزاری برای کاهش دادن سمیت فلزی متداول است و برای زیست‌پالایی مورد استفاده قرار گرفته است (گاد، ۲۰۰۴؛ والز و دِلورنزو، ۲۰۰۲). به عنوان مثال، بسیاری از جانداران به طور کارآمدی Cr(VI) را توسط رداکتازهای وابسته به NAD(P)H یا سیتوکروم‌ها و یا سولفید هیدروژن تولید شده میکروبی به Cr(III) کاهش می‌دهند (لوییـد، ۲۰۰۳؛ لاولی و کوتز، ۱۹۹۷). همچنین باکتری‌ها از ساز و کارهای مختلفی برای کاهش شبه‌فلزهایی مانند سلنیوم استفاده می‌کنند، و این پدیده در کارهای زیست‌پالایی مورد استفاده قرار گرفته است (لانگ و همکاران، ۱۹۹۰؛ اُرملند و همکاران، ۱۹۹۱). Pdtc یک مولکول طبیعی منحصر به فرد است که ویژگی‌های زیادی دارد و می‌توان آن را برای استفاده در فرایندهای زیست‌پالایی به کار گرفت.

۱۲-۷- نتیجه‌گیری

در میان سیدروفورهای شناخته شده pdtc کاربردی‌ترین است و نقشی روشن در بهینه‌سازی محیط باکتریایی دارد (بودزیکیویچ، ۲۰۰۳). در این‌جا فعالیت‌های شناخته شده جدید pdtc را بررسی کردیم و فهمیدیم که رسوب‌های ایجاد شده‌ی pdtc با فلزهای سنگین ناپایدار هستند. کمپلکس‌های فلز سنگین: pdtc تجزیه می‌شوند و سولفیدهای فلزی به شکل رسوبات را آزاد می‌کنند. همچنین برهم‌کنش‌های شیمیایی pdtc را با اُکسی‌آنیون‌های سمی سلنیوم و تلوریم توضیح دادیم. Pdtc و سولفیدهای مشتق شده از آن، Se(IV) و Te(IV) را کاهش می‌دهند و سلنیدها و تلوریدهای pdtc در محلول رسوب می‌کنند. این ترکیب‌های نامحلول هیدورلیز شده، سلنیوم و تلوریم فلزی را آزاد می‌کنند که همچنان نامحلول بوده و بنابراین از نظر زیستی فراهم نبوده و سمی نیستند. رسوب‌های Se^0 و Te^0 ایجاد شده در محیط کشت‌های *سودوموناس استوتزری* KC تولید کننده pdtc دارای ویژگی‌هایی مشابه با همان رسوب‌هایی بودند که در واکنش‌های غیرزیستی با واسطه pdtc ساخته شده به روش شیمیایی با خلوص بالا ایجاد شده بودند. افزون بر این، موقعیت برون یاخته‌ای Se^0 فرضیه‌ی ساز و کار سمیت‌زدایی با واسطه pdtc را

حمـایـت کرد. همچنین فهمیـدیم کـه pdtc می‌تواند کروم (VI) ســـمی و پویا را به کروم (III) با ســمیت و پویایی کمتر کاهش دهد و Cr(III) را کلات کند و ســپس آن را به شــکل ســولفیدهای کروم و احتمالاً اکســیدها و هیدروکســیدهای کروم آزاد کند. *ســودوموناس اســتوتزری* KC تولید کننده pdtc در مقایســه با ســویه CTN1 جهش یافته pdtc منفی مقاومت بالاتری را نســبت به فلزهای سمی ایجاد کرد.

نتایج ما به روشــنی بیان می‌کند که pdtc در ســمیت‌زدایی فلز ســنگین و شــبه‌فلز نقش دارد. مولکول pdtc می‌تواند به عنوان یک کاهنده عمل کرده، ســولفید هیدروژن واکنش‌پذیر از هیدرولیز را تـأمین کرده و کمپلکس‌هـای فلز: pdtc فعال رداکس تولید کند که می‌تواند الکترون‌ها را به یک ســوبسترا مانند Cr(VI) انتقال داده و آن را به Cr(II) کاهش دهد. سمیت‌زدایی با واسطه pdtc از ویژگی شیمیایی فلزهای سنگین (مانند میل ترکیبی بسیار بالای آن‌ها به گوگرد) استفاده می‌کند تا آن‌ها را از محلول بیرونی یاخته‌ها به واسـطه رسـوب فلزها به شکل سولفیدهای نامحلول حذف کند (نیس، ۱۹۹۹؛ راب و فِلـدمن، ۲۰۰۳؛ والس و دِلورنزو، ۲۰۰۳). همچنین pdtc می‌توانـد بـه عنوان یک مخزن برون یاخته‌ای از تیول‌ها در نظر گرفته شـود که واسطه انجام واکنش‌های برون یاخته‌ای شــده و با جلوگیری از ورود فلز به درون یاخته‌ها جلوی ســمیت فلز در درون یاخته را بگیرد. برای *ســودوموناس استوتزری* KC هزینه نهایی تولید pdtc (از نظر انرژی) در نهایت ممکن است کم‌تر از هزینه متابولیکی مورد نیاز برای مدیریت فلزهای ســنگین ســمی در درون یاخته‌ها باشــد. Pdtc عضـوی از یک کلاس جدید متابولیت‌های میکروبی با طیف گسترده‌ی از ویژگی‌های منحصر به فرد اســت. پژوهش مـا از این فرضــیه کـه pdtc در بهینه‌ســازی محیط باکتریایی در مورد فلزها و شــبه‌فلزهای مختلف نقش دارد، حمایت می‌کند. این پژوهش لیســت نقش‌های pdtc را گســترش می‌دهد که شامل نقش آن به عنوان یک سیدروفور، فعالیت در تجزیه تتراکلرید کربن، و ویژگی‌های ضد میکروبی است. به عنوان یک سازوکار سمیت‌زدایی فلز با واسطه pdtc می‌توانیم نقش pdtc در کاهش فلز و شبه‌فلز که سبب رسوب شبه‌فلز به شکل عنصری یا سولفیدهای فلزی می‌شود را اضافه کنیم. این مورد برای یـک لیگـانـد ســیـدروفور کـه به عنوان یک حامل گروه تیول به برون یاخته باکتریایی عمل کند (جایی‌که آن‌ها می‌توانند از ســاز و کارهای مختلف برای کاهش ســمیت فلز و شبه‌فلز استفاده کنند) منحصر به فرد است. این ساز و کارها شامل کاهش فلز به وضعیتی با سمیت کمتر، تشـکیل کمپلکس‌های نامحلول، و رسوب فلزها به عنوان سولفیدهای نامحلول است. تنوع بالا در برهم‌کنش pdtc بـا آلاینـده‌هـای محیطی از جمله شــبه‌فلزها، فلزها، و حلال‌های کلردار مانند تتراکلرید کربن، *ســودوموناس اســتوتزری* KC را به یک مورد عالی برای اســتفاده در فرایندهای زیست‌پالایی تبدیل کرده است (کورتز و همکاران، ۲۰۰۲؛ دی‌باس و همکاران، ۱۹۹۸).

منابع

Aguilera S, Aguilar ME, Chavez MP, Lopez-Meza JE, Pedraza-Reyes M, Campos-Garcia J, Cervantes C (2004) Essential residues in the chromate transporter ChrA of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Lett 232:107–112.

Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev 27:215–237.

Brandon MS, Paszczynski AJ, Korus R, Crawford RL (2003) The determination of the stability constant for the iron(II) complex of the biochelator pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid). Biodegradation 14:73–82.

Budzikiewicz H (1993) Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiol Rev 10:209–228.

Budzikiewicz H (2003) Heteroaromatic monothiocarboxylic acids from Pseudomonas spp. Biodegradation 14:65–72.

Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutierrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzman JC, Moreno-Sanchez R (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol Rev 25:335–347.

Chardin B, Giudici-Orticoni MT, De Luca G, Guigliarelli B, Bruschi M (2003) Hydrogenases in sulfate reducing bacteria function as chromium reductase. Appl Microbiol Biotechnol 63:315–321.

Cortese MS, Paszczynski AJ, Lewis TA, Sebat JL, Borek V, Crawford RL (2002) Metal chelating properties of pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by Pseudomonas spp. and the biological activities of the formed complexes. Biometals 15:103–120.

Criddle CS, DeWitt JT, Grbic-Galic D, McCarty PL (1990) Transformation of carbon tetrachloride by Pseudomonas sp. strain KC under denitrification conditions. Appl Environ Microbiol 56:3240–3246.

Dhungana S, Crumbliss AL (2005) Coordination chemistry and redox processes in siderophore mediated iron transport. Geomicrobiol J 22:87–98.

Diels L, DeSmet M, Hooyberghs L, Corbisier P (1999) Heavy metal bioremediation of soil. Mol Biotechnol 12:149–158.

Diels L, van der Lelie N, Bastiaens L (2002) New developments in treatment of heavy-metal contaminated soils. Rev Environ Sci Biotechnol 1:75–82.

Dybas MJ, Barclona M, Bezborodnikov S, Davies S, Forney L, Heuer H, Kawka O, Mayotte T, Sepulveda-Torres Ld C, Smalla C, Sneathen M, Tiedje J, Voice T, Wiggert DD, Witt ME.

Criddle CS (1998) Pilot-scale evaluation of bioaugmentation for in situ remediation of a carbon tetrachloride-contaminated aquifer. Environ Sci Technol 32:3598–3611.

Espinet P, Lorenzo C, Miguel JA (1994) Palladium complexes with the tridentate dianionic ligand pyridine-2,6-bis(thocarboxylate), pdtc. Crystal structure of (n-Bu4N)[Pd(pdtc)Br]. Inorg Chem 33:2052–2055.

Essén SA, Johnsson A, Bylund D, Pedersen K, Lundström US (2007) Siderophore production by Pseudomonas stutzeri under aerobic and anaerobic conditions. Appl Environ Microbiol 73:5857–5864.

Evanko CR, Dzombak DA (1997) Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. Technology Evaluation Report TE-97-01. USEPA Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh, PA, USA.

Fekete FA, Barton LL (1992) Effects of iron(III) analogs on growth and pseudobactin synthesis in a chromium-tolerant Pseudomonas isolate. Biol Met 4:211–216.

Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122:109–119.

Hildebrand U, Lex J (1989) Untersuchungen zur Struktur von Co (III)-und Ni(II)-Komplexen derPyridin-2,6-di(monothiocarbonsäure). Z Naturforsch 44b:475–480.

Hildebrand U, Lex J, Taraz K, Winkler S, Ockels W, Budzikiewicz H (1984) Untersuchungen zum Redox-System bis-(pyridin-2,6-dicarbothioato)-ferrat(II)/-ferrat(III). Z Naturforsch 39b:1607–1613.

Hildebrand U, Ockels W, Lex J, Budzikiewicz H (1983) Zur Struktur eines 1:1-Adduktes von Pyridin-2,6-dicarbothiosäure und Pyridin. Phosphorus Sulfur 16:361–364.

Hildebrand U, Taraz K, Budzikiewicz H, Korth H, Pulverer G (1985) Dicyano-bis-(pyridin-2,6-dicarbothioato)-ferrat(II)/ferrat(III), ein

weiteres eisenhaltiges Redoxsystem aus der Kulturlösung eines Pseudomonas-stammes. Z Naturforsch 40c:201–207.

Hockin SL, Gadd GM (2003) Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 69:7063–7072.

Hu XC, Boyer GL (1996) Siderophore-mediated aluminum uptake by Bacillus megaterium ATCC 19213. Appl Environ Microbiol 62:4044–4048.

Kessi J, Hanselmann KW (2004) Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by Rhodospirillum rubrum and Escherichia coli. J Biol Chem 279:50662–50669.

Leach LH, Morris JC, Lewis TA (2007) The role of the siderophore pyridine-2,3-bis(thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by Pseudomonas putida DSM 3601. Biometals 20:717–726.

Lee C-H, Lewis TA, Paszczynski AJ, Crawford RL (1999) Identification of an extracellular catalyst of carbon tetrachloride dehalogenation from Pseudomonas stutzeri strain KC as pyridine-2,6-bis(thiocarboxylate). Biochem Biophys Res Commun 261:562–566.

Lewis TA, Leach L, Morales S, Austin PR, Hartwell HJ, Kaplan B, Forker C, Meyer JM (2004) Physiological and molecular genetic evaluation of the dechlorination agent, pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid) (PDTC) as a secondary siderophore of Pseudomonas. Environ Microbiol 6:159–169.

Lloyd JR (2003) Microbial reduction of metals and radionuclides. FEMS Microbiol Rev 27:411–425.

Long RHB, Benson SM, Tokunaga TK (1990) Selenium immobilization in a pond sediment at Kesterson Reservoir. J Environ Qual 19:302–311.

Lovley DR, Coates JD (1997) Bioremediation of metal contamination. Curr Opin Biotechnol 8:285–289.

Neu MP, Johnson MT, Matonic JH, Scott BL (2001) Actinide interactions with microbial chelators: the dioxobis[pyridine-2,6-bis (monothiocarboxylato)]uranium(VI) ion. Acta Crystallogr C 57:240–242.

Newman DK, Beveridge TJ, Morel FMM (1997) Precipitation of arsenic trisulfide by Desulfotomaculum auripigmentum. Appl Environ Microbiol 63:2022–2028.

Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol 51:730–750.

Nyman MD, Hampden-Smith MJ, Duesler EN (1997) Synthesis, characterization, and reactivity of group 12 metal thiocarboxylates, M(SOCR)2Lut2 [M = Cd, Zn; R = CH3, C(CH3)3; Lut = 3,5-dimethylpyridine (Lutidine)]. Inorg Chem 36:2218–2224.

Ockels W, Römer A, Budzikiewicz H (1978) An Fe(III) complex of pyridine-2,6-di(monothiocarboxylic acid) — a novel bacterial metabolic product. Tetrahedron Lett 36:3341–3342.

Oremland RS, Steinberg NA, Presser TS, Miller LG, Hollibaugh JT (1991) In situ bacterial selenate reduction in the agricultural drainage systems of Western Nevada. Appl Environ Microbiol 57:615–617.

Painter EP (1941) The chemistry and toxicity of selenium compounds with special reference to the selenium problem. Chem Rev 28:179–213.

Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S, Matin A (2000) Purification to homogenity and characterization of a novel Pseudomonas putida chromate reductase. Appl Environ Microbiol 66:1788–1795.

Raab A, Feldmann J (2003) Microbial transformation of metals and metalloids. Sci Prog 86:179–202.

Sebat JL, Paszczynski AJ, Cortese MS, Crawford RL (2001) Antimicrobial properties of pyridine-2,6-dithiocarboxylic acid, a metal chelator produced by Pseudomonas spp. Appl Environ Microbiol 67:3934–3942.

Stolworthy JC, Paszczynski AJ, Korus R, Crawford RL (2001) Metal binding by pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid), a biochelator produced by Pseudomonas stutzeri and Pseudomonas putida. Biodegradation 12:411–418.

Turner RJ, Aharonowitz Y, Weiner JH, Taylor DE (2001) Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in Escherichia coli. Can J Microbiol 47:33–40.

Valls M, de Lorenzo V (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiol Rev 26:327–338.

Visca P, Colotti G, Serino L, Verzili D, Orsi N, Chiancone E (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in Pseudomonas aruginosa and functional effects of siderophore-metal complexes. Appl Environ Microbiol 58:2886–2893.

Zawadzka AM, Crawford RL, Paszczynski AJ (2007) Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by Pseudomonas stutzeri KC reduces chromium(VI) and precipitates mercury, cadmium, lead, and arsenic. Biometals 20:145–158.

Zawadzka AM, Crawford RL, Paszczynski AJ (2006a) Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by Pseudomonas stutzeri KC reduces and precipitates selenium and tellurium oxyanions. Appl Environ Microbiol 72:3119–3129.

Zawadzka AM, Vandecasteele FPJ, Crawford RL, Paszczynski AJ (2006b) Identification of siderophores of Pseudomonas stutzeri. Can J Microbiol 52:1164–1.

فصل سیزدهم

استخراج زیستی (زیست‌استخراجی) ریزجانداران: دیدگاه‌های مولکولی و کاربردها در بیوتکنولوژی و زیست‌پالایی

Carlos A. Jerez

۱۳-۱- مقدمه

انحلال میکروبی فلزها به طور گسترده و موفقیت‌آمیزی در فرایندهای صنعتی استفاده شده و اصطلاحاً آبشویی زیستی سنگ‌های معدن یا استخراج زیستی نامیده می‌شود. در این فرایند میکروب‌ها فلزهایی مانند مس، طلا، اورانیوم و دیگر (فلزها) را استخراج می‌کنند (راولینگز، ۲۰۰۲؛ واتلینگ، ۲۰۰۶). این فرایند توسط ریزجانداران کمولیتواتوتروف[1] انجام می‌شود. این ریزجانداران متعلق به گروهی معروف به سختی‌دوست‌ها[2] هستند. زیرا در شرایط به شدت اسیدی (pH = ۱-۳) و در حضور غلظت‌های بسیار سمی فلزهای سنگین زندگی می‌کنند. طیف گسترده‌ای از ریزجانداران قادر به رشد در شرایطی هستند که عملیات تجاری استخراج زیستی را شبیه‌سازی نمایند و بسیاری از گونه‌های مختلف ریزجانداران ممکن است در مکان‌های زهاب اسیدی معدن[3] (AMD) زندگی کنند (هالبرگ و جانسون، ۲۰۰۱؛ شیپرز، ۲۰۰۷). بیشترین باکتری‌های فروشویی‌کننده مطالعه شده از جنس *اسیدی‌تیوباسیلوس* هستند. *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و *تیواکسیدانس* معتدل‌دوست‌های اسیددوست هستند و همراه با *اسیدی‌تیوباسیلوس کالدوس*[4] نسبتاً گرمادوست، متعلق به گاما- پروتئوباکتری‌های گرم-منفی هستند. *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* یک باکتری کمولیتواتوتروف است که انرژی خود را از اکسید کردن آهن دو ظرفیتی، گوگرد عنصری، یا ترکیب‌های گوگردی که تا حدودی (به طور ناقص) اکسید شده‌اند دریافت می‌کند (لاندگِرن، ۱۹۸۰؛ سوزوکی، ۲۰۰۱؛ راولینگز، ۲۰۰۲؛ اولسون و همکاران، ۲۰۰۳).

اعضای جنس *لپتوسپیریلوم* از دیگر باکتری‌های مهم استخراج‌کننده زیستی هستند که به رده جدید باکتریایی *نیتروسپورا*[5] تعلق دارند. برخی باکتری‌های فروشویی کننده گرم-مثبت از جنس‌های *اسیدی‌میکروبیوم*[6]، *فری‌میکروبیوم*[7] و *سولفوباسیلوس*[8] نیز مشخص شده‌اند (هالبرگ و جانسون، ۲۰۰۱؛ شیپرز، ۲۰۰۷). استخراج زیستی در آرکی‌های بسیار گرمادوستِ اکسیدکننده گوگرد و آهن دو ظرفیتی از سال‌ها پیش شناخته شده است. آن‌ها بیشتر از جنس *سولفولوبوس*[9]،

---

1. Chemolithoautotrophic
2. Extremophiles
3. Acid mine drainage
4. *caldus*
5. *Nitrospora*
6. *Acidimicrobium*
7. *Ferrimicrobium*
8. *Sulfobacillus*
9. *Sulfolobus*

اسیدیانوس[1]، *متالواسفائرا*[2] و *سولفوری‌اسفائرا*[3] هستند. اخیراً برخی از آرکئاهای میانه‌دوست اکسیدکننده آهن دو ظرفیتی متعلق به *ترموپلاسماها*[4] نیز جداسازی و توصیف شده‌اند که شامل *فروپلاسما اسیدی‌فیلیوم*[5] و *فروپلاسما اسیدآرمانوس*[6] هستند. در حقیقت، یک مجموعه از ریزجانداران مختلف مسئول واکنش‌های اکسیداتیو هستند که سبب استخراج مقادیر فلز حل شده از سنگ‌های معدن می‌شوند (هالبرگ و جانسون، ۲۰۰۱؛ شیپرز، ۲۰۰۷).

۱۳-۲- پویایی فلزی و تولید زهاب اسیدی معدن (AMD)

تعدادی از واکنش‌های اصلی اکسیداسیون که اسیددوست‌ها می‌توانند آن‌ها را کاتالیز کنند شامل موارد زیر است:

$$\text{Ferrous iron } 2Fe^{2+} + 0.5O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Fe^{3+} + H_2O$$
$$\text{General metal sulfide } MS + 2O_2 \rightarrow M^{2+} + SO_4 + H^+$$
$$\text{Pyrite } 4FeS_2 + 15O_2 + 2H_2O \rightarrow 2Fe_2(SO_4)3 + 2SO_4 + 2H^+$$
$$\text{Chalcopyrite } CuFeS_2 + 4Fe^{3+} \rightarrow 5Fe^{2+} + Cu^{2+} + 2S^0$$
$$\text{Sulfur} S^0 + 1\tfrac{1}{2}O_2 + H_2O \rightarrow SO_4 + H^+$$

این واکنش‌ها نه تنها فلزهای موجود در کانی‌ها را حل می‌کنند بلکه اسید سولفوریک نیز تولید می‌نمایند. بنابراین، ریزجانداران اسیددوست، نه تنها قادر به مقاومت در برابر مقادیر پایین pH هستند بلکه می‌توانند غلظت‌های بسیار بالای فلز را نیز تحمل کنند (دوپسون و همکاران، ۲۰۰۳). زیرا دارای ساز و کارهای سمیت‌زدایی یا مقاومت به فلز سنگین هستند (داس و همکاران، ۱۹۹۸؛ بوتچر و همکاران، ۲۰۰۰؛ دوپسون و همکاران، ۲۰۰۳؛ آلوارز و جرز، ۲۰۰۴؛ رِمونسِلز و همکاران، ۲۰۰۶). باکتری‌های خنثی‌دوست[7] هم ساز و کارهای مقاومت به فلز دارند که هم شامل برون‌ریزی فعال فلز و هم سمیت‌زدایی یون‌های فلزی با دگرگونی آن است. به عنوان مثال، در مورد مس، (این ساز و کارها) شامل کمپلکس کردن درون یاخته‌ای، کاهش تجمع، کمپلکس کردن خارج یاخته‌ای یا ترسیب در پری‌پلاسم می‌شود. باکتری‌های خنثی‌دوست می‌توانند در گستره‌ای از غلظت‌های مس بین ۱ تا ۸ میلی‌مولار بسته به گونه باکتری رشد کنند (آیوتن و همکاران، ۲۰۰۱؛ پوئیگ و همکاران، ۲۰۰۲). البته اسیددوست‌هایی مانند *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* یا آرکئاهایی

1. *Acidianus*
2. *Metallosphaera*
3. *Sulfurisphaera*
4. *Thermoplasmales*
5. *Ferroplasma acidiphilium*
6. *Acidarmanus*
7. Neutrophilic

مـانند *سـولفولوبوس متالیکوس*[1]، به ترتیب می‌توانند در برابر غلظت‌های بالاتر مس از ۸۰۰ mM (داس و همکاران، ۱۹۹۸) و ۲۰۰ mM (دوپسـون و همکارن، ۲۰۰۳) نیز مقاومت کنند. به احتمال زیاد، اسـیددوسـت‌ها سـاز و کارهای بیشـتری از آن‌چه که در خنثی‌دوسـت‌ها موجود اسـت را دارا هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد چنین مقاومت فلزی چشم‌گیری داشته باشند. گفته شده است که ریزجاندارانی مانند برخی از باکتری‌های اسـیددوسـت کمولیتواتوتروف و آرکئاها مقادیر زیادی از پلی‌فسفات معدنی (poly P) را انباشت می‌کنند که این پلیمرها ممکن است به طور فعالی در حذف فلزهای سـنگین سـمی مانند مس دخالت داشـته باشند (آلوارز و جرز، ۲۰۰۴؛ رِمونسِلز و همکاران، ۲۰۰۶). این سـم‌زدایی از طریق هیدرولیزآنزیمی poly Pکه فسـفات آزاد تولید می‌کند رخ خواهد داد. این فسـفات آزاد فلز مازاد در سـیتوپلاسـم را به شـکل کمپلکس فسفات- فلز در آورده و از راه ناقل‌های فسـفات به بیرون یاخته منتقل می‌شـود. این ویژگی‌ها سـبب شده‌اند که این ریزجانداران برای کاربرد در استخراج زیستی بسیار مناسب باشند. همچنین آن‌ها برای حذف ترکیب‌های پیریت و گوگرد از زغال سـنگ، و برای زیسـت‌پالایی یا حذف فلزهای سـنگین از مکان‌های آلوده اسـتفاده می‌شوند.

۱۳-۳- جنبه‌های مولکولی برهم‌کنش‌های ریزجانداران اسیددوست با کانی‌ها

مشـخص شـده اسـت که بیشـتر باکتری‌های فروشـویی‌کننده می‌توانند با چسـبیدن به سـطح سـوبسـتراهای جامد مانند گوگرد عنصـری و سـولفیدهای فلزی رشد کنند. این چسبیدن، بیشتر با مواد پلیمری برون یـاختـه‌ای[2] (EPS) پیرامون یـاختـه‌هـا انجـام می‌شـود و ترکیب آن مطابق با سـوبسترای رشد تنظیم می‌شود. باکتری‌ها از طریق پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای به سطح کانی دارای Fe(III) می‌چسـبند. پس از این‌که ریزجاندار یک زیست‌لایه ایجاد کرد، این فلز به طور شیمیایی به سـولفید حمله کرده و برای نمونه اگر آن سولفید پیریت باشد، آهن دو ظرفیتی و تیوسولفات ایجاد می‌کند که آهن دو ظرفیتی دوباره به Fe(III) و تیوسـولفات به اسـید سـولفوریک اکسـید می‌شود (رُوردِر و همکاران، ۲۰۰۳). این تماس نزدیک باکتری با کانی سبب اکسایش ویژه و کارآمد سولفید می‌شود.

آهن سـه ظرفیتی به روش شیمیایی سولفیدهای فلزی نامحلول را به سولفات‌های فلزی محلول اکسید می‌کند و خود کاهش می‌یابد. نقش اصلی ریزجاندارن اکسایش دوباره این آهن دو ظرفیتی و تولید آهن سـه ظرفیتی بیشـتر اسـت. در سـال‌های گذشـته تلاش زیادی برای درک زیست‌شیمی اکسـیداسیون ترکیب‌های آهن و گوگرد (رُوردِر و سَند، ۲۰۰۳؛ رامیرز و همکاران، ۲۰۰۴؛ راولینگز،

1. *metallicus*
2. Extracellular polymeric substances

۲۰۰۵؛ والنزوئلا و همکاران، ۲۰۰۶)، برهم‌کنش باکتری‌ها با کانی‌ها (کموتاکسی، سامانه درک حد نصاب، چسبندگی، تشکیل لایه زیستی) (جرز ۲۰۰۸؛ رویز و همکاران، ۲۰۰۸) و پاسخ‌های سازگاری چندگانه که به ریزجانداران اجازه زنده‌مانی در محیط فروشویی زیستی را می‌دهد (داس و همکاران، ۱۹۹۸؛ بوتچر و همکاران، ۲۰۰۰؛ دوپسون و همکاران، ۲۰۰۳؛ آلوارز و جرز، ۲۰۰۴؛ رِمونسِلز و همکاران، ۲۰۰۶؛ چی و همکاران، ۲۰۰۷؛ کواترینی و همکاران، ۲۰۰۷؛ وِرا و همکاران، ۲۰۰۸) انجام شده است. همه این‌ها پدیده‌های کلیدی برای درک فرایند استخراج زیستی هستند.

واکنش‌های درگیر در اکسیداسیون آهن دو ظرفیتی توسط *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* به تفصیل مطالعه شده‌اند. در مسیر انتقال الکترون از آهن دو ظرفیتی به اکسیژن، به نظر می‌رسد که پذیرنده پایانی الکترون یک سیتوکروم اکسیداز متصل به غشای سیتوپلاسمی باشد. انتقال الکترون‌ها از طریق چندین حامل پری‌پلاسمی، که شامل حداقل پروتئین مس آبی روستی‌سیانین[1]، و سیتوکروم c552 هستند، رخ خواهد داد.

سیتوکروم Cyc2 که یک نوع سیتوکروم c با وزن مولکولی بالا است به عنوان نخستین پذیرنده الکترون در مسیر تنفسی بین آهن دو ظرفیتی و اکسیژن درگیر شده است (یارزابِل و همکاران، ۲۰۰۴؛ راولینگز، ۲۰۰۵). این مسیر به شکل: Cyc2 ⟵ روستی‌سیانین ⟵ Cycl(c552) ⟵ سیتوکروم اکسیداز aa3 نشان داده می‌شود. افزون بر این، یک مسیر جایگزین برای انتقال الکترون از طریق کمپلکس‌های bc(1) و اکسیدازهای پایانی در *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* وجود دارد (بروسلا و همکاران، ۲۰۰۷).

اکسیداسیون هوازی گوگرد عنصری توسط *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* و دیگر ریزجانداران توسط یک دی‌اکسیژناز گوگردی انجام می‌شود (سیلور و لاندگِرن، ۱۹۶۸؛ سیگیو و همکاران، ۱۹۸۷؛ کِلی و همکاران، ۱۹۹۷؛ سوزوکی، ۱۹۹۹؛ رُوردِر و سَند، ۲۰۰۳؛ مولر و همکاران، ۲۰۰۴). تیوسولفات به عنوان یک ترکیب کلیدی در اکسیداسیون بخش گوگردی پیریت مطرح شده است (شیپرز و سَند، ۱۹۹۹). یون‌های آهن (III) عوامل انحصاری اکسیدکننده برای انحلال هستند. تیوسولفات در نهایت در یک فرایند دوره‌ای به سولفات تجزیه خواهد شد و گوگرد عنصری یک محصول جانبی است. برخی از واکنش‌های اکسید شدن آهن دو ظرفیتی و ترکیب‌های گوگردی که در سطح *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* رخ می‌دهند در شکل ۱۳-۱ نشان داده شده است.

ابزارهای موثر برای مطالعه ژنتیک و فیزیولوژی *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* با وجود تلاش‌های چشم‌گیر، کاربرد گسترده‌ی پیدا نکردند و درک فیزیولوژی غیرمعمول آن در سطحی ابتدایی باقی مانده است. هنوز یک روش کارآمد و تجدیدپذیر[2] برای انتقال DNA وجود ندارد

1. Rusticyanin
2. Reproducible

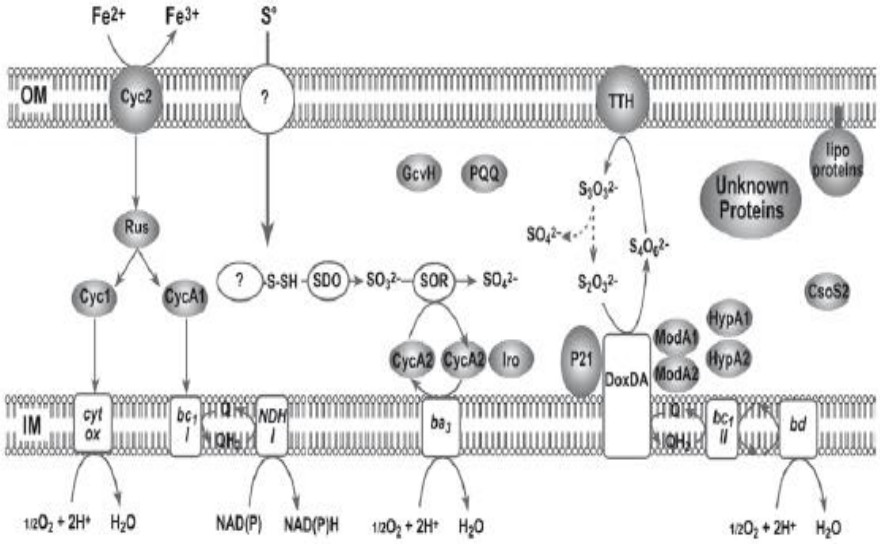
(راولینگز، ۲۰۰۵؛ والِنزولا و همکاران، ۲۰۰۶). *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* اولین ریزجاندار با توانایی استخراج زیستی بود که ژنوم آن کاملاً توالی‌یابی شد و تفسیر تمامی ژن‌های آن در دسترس است (http://www.tigr.org). این داده‌ها برای بسیاری از پژوهش‌گران بسیار مفید بوده است. پژوهش‌گران با استفاده از این داده‌ها می‌توانند جستجو کنند که کدام ژن‌ها در مسیرهای متابولیکی و عملکردهای فیزیولوژی مهم نقش دارند و عملکرد بسیاری از ژن‌های جدید را پیش‌بینی کنند. تمرکز اصلی پژوهش‌ها متابولیسم انرژی بوده که مستقیماً مسئول فروشویی زیستی است. بعضی از پژوهش‌گران از روش کروموزوم پیمایی[1] برای یافتن ژن‌های درگیر در متابولیسم گوگرد و آهن استفاده کرده‌اند (راولینگز، ۲۰۰۵؛ والِنزولا و همکاران، ۲۰۰۷). پژوهش‌های ژنومیک (کوترینی و همکاران، ۲۰۰۶) و پروتئومیک با کارایی بالا از پاسخ‌های تنظیمی که ریزجانداران استخراج زیستی برای سازگاری با تغییر محیط‌شان استفاده می‌کنند در حال ظهور هستند (والِنزولا و همکاران، ۲۰۰۶). به عنوان مثال، کل مجموعه پروتئین‌های پری‌پلاسمیک (در حدود ۱۳۰) *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* رشد کرده در محیط تیوسولفات به طور آزمایشی و با استفاده از پروتئومیک با توانایی بالا تعیین شده‌اند. حدود ۳۰ درصد از این پروتئین‌ها بدون همولوگ هستند (در پایگاه داده‌ای موجود می‌باشند) (پروتئین‌های ناشناخته در شکل۱۳-۱)، که به احتمال زیاد مشخصه‌ی این باکتری بوده و ممکن است نقش‌های مهمی داشته باشند که هنوزتعیین نشده است (چی و همکاران، ۲۰۰۷).

متاژنومیک آنالیز ژنومیک مستقل از کشت در جوامع میکروبی است (هَندلزمن، ۲۰۰۴؛ استریت و اشمیت، ۲۰۰۵). در روش توالی‌یابی شلیکی[2]، همه قطعات حاصل از همسانه‌های همان ژنوم به دست می‌آیند. برای آنالیز ژنوم جوامع میکروبی محیطی، وضعیت ایده‌آل، داشتن محیطی با تنوع کم است. چنین سامانه‌هایی در هنگام آنالیز جوامع میکروبی مستقر در یک زیست‌لایه گسترش یافته در مکان تولید زیاد AMD یافت شدند. با این حال تغییرات درون گونه‌ای ممکن است سرهم‌کردن قطعه‌های DNA را پیچیده کند. با این وجود، در توالی‌یابی شلیکی تصادفی DNA از این زیست‌لایه اسیددوست طبیعی استفاده شد (تایسِن و همکاران، ۲۰۰۴). این پژوهش‌گران توانستند ژنوم‌های *لپتوسپیریلوم* گروه II و *فروپلاسما* نوع II را تقریباً به طور کامل بازسازی کنند و سه ژنوم دیگر را تا حدودی بازیافت کنند. ترکیب شرایط بسیار اسیدی زیست‌لایه (pH در حدود ۰/۵) و منبع انرژی نسبتاً محدود سبب انتخاب تعداد کم گونه‌ها شد که موقعیتی ایده‌آل برای آزمایش روش‌های جدید ژنومیک مستقل از کشت در محیط است (تایسِن و همکاران، ۲۰۰۴).

---

1. Chromosome walking
2. Shotgun

آنالیز مکمل ژن برای هر جاندار مسیرهای متابولیکی برای تثبیت کربن و نیتروژن و تولید انرژی را نشـان داد. به عنوان مثال، ژن‌های سـاخت زیستیِ لیپیدهای ایزوپرنوییدی و انواعی از سامانه‌های برون‌ریز پروتونی شـناسـایی شـدند که بینشی را در رابطه با روش‌های زنده‌مانی در محیط به شدت اسـیدی ارائه می‌دهد. البته این داده‌ها بایسـتی با روش‌های زیسـت‌شـیمیایی و فیزیولوژیکی تأیید شـوند. واضـح اسـت که روش متاژنومیک در مطالعه جوامع میکروبی، یک پیشـرفت واقعی در درک کامل چگونگی عملکرد جوامع میکروبی پیچیده و برهم‌کنش اعضـای آن‌ها در درون نیچ‌هایشـان است.



شکل ۱۳-۱ طرح کلی که نشان می‌دهد چگونه یک اسیددوست کمولیتواتوتروفی مانند *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسـیدانس* آهن دو ظرفیتی، گوگرد و ترکیب‌های گوگردی کاهش‌یافته را برای تولید اسید سولفوریک اکسـید می‌کند. پروتئین‌های سـطحی *اسـیدی‌تیوباسـیلوس فرواکسیدانس، که* بیشتر آن‌ها پروتئین‌های پری‌پلاسـمی درگیر در متابولیسـم انرژی هسـتند، نشان داده شده‌اند. پروتئین‌هایی که با رنگ خاکستری نشـان داده شـده‌اند به صـورت آزمایشـی و توسـط آنالیز پروتئومی بخش پری‌پلاسـمی شناسایی شدند. پروتئین‌های پری‌پلاسـمی ناشـناخته به احتمال زیاد منحصراً در *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* وجود داشـته و ممکن است چندین عملکرد ناشناخته متفاوت داشته باشند (چی و همکاران، ۲۰۰۷) (برگرفته از واولینگز، ۲۰۰۵؛ چی و همکاران، ۲۰۰۷ و جرز، ۲۰۰۸).

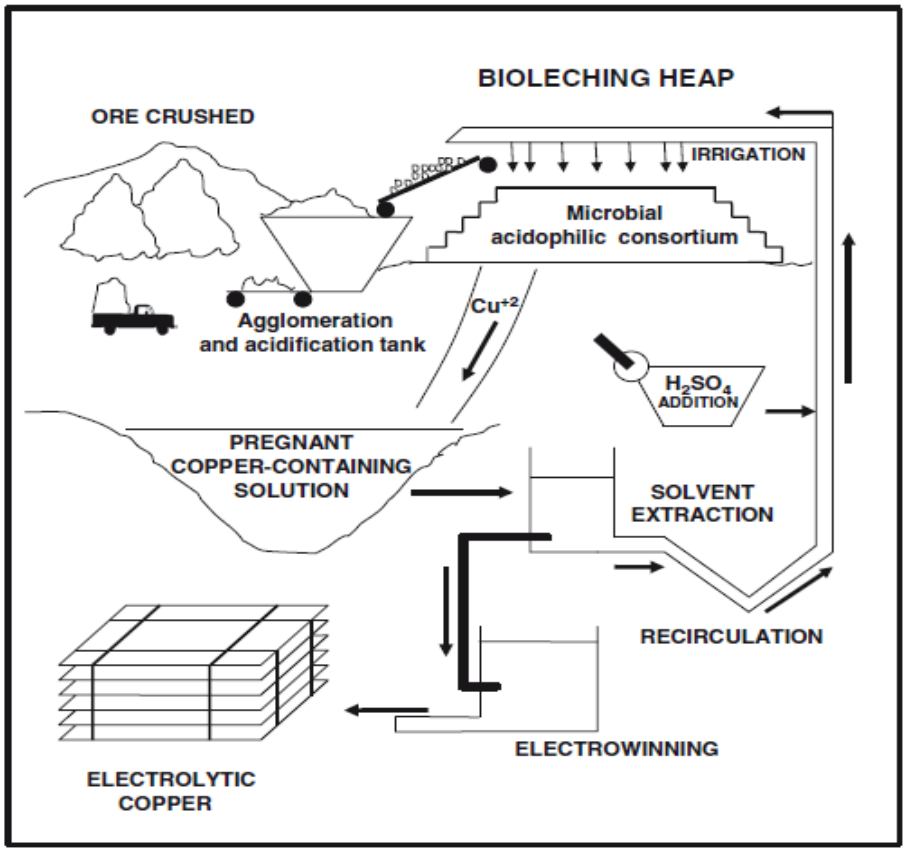
از روش متاپروتئومیک برای مطالعه جامعه در یک زیست‌لایه میکروبی AMD طبیعی استفاده شده است (رام و همکاران، ۲۰۰۵؛ لو و همکاران، ۲۰۰۷). این پژوهش‌گران توانستند ۲۰۳۳ پروتئین از پنج گونه فراوان در زیست‌لایه را شناسایی کنند که ۴۸ درصد پروتئین‌های پیش‌بینی شده از جاندار غالب زیست‌لایه یعنی *لپتوسپیریلوم* گروه II بود. پژوهش‌گران همچنین مشخص کردند که یکی از این پروتئین‌های جدید که به وفور نیز یافت می‌شود، یک نوع سیتوکروم بوده که در اکسیداسیون آهن و تشکیل زهاب اسیدی معدن در زیست‌لایه طبیعی نقش مرکزی دارد (رام و همکاران، ۲۰۰۵). لو و همکاران (۲۰۰۷) مجموعه داده‌های ژنومیک جامعه را به کار بردند تا پروتئین‌های بیان شده از عضو غالب یک زیست‌لایه اسیددوست طبیعی که از نظر ژنومی ناشناخته بود را در حد گونه شناسایی کنند. پروتئومیک، تبادل ژنتیکی بین جمیعت را نشان داد، که ممکن است در سازگاری نیچ‌های اکولوژیکی ویژه درون محیط بسیار اسیدی سرشار از فلز، حیاتی باشند. همه این دانش همراه با آن‌چه که در دیگر ریزجانداران فروشویی کننده زیستی حاصل شده است، پیشرفت‌های آینده در فرایندهای فروشویی زیستی صنعتی و زیست‌پالایی را امکان‌پذیر خواهند ساخت.

اخیراً، توصیف نظری و عملیِ چگونگی توسعه و بهینه‌سازی یک مجموعه میکروبی اکسیدکننده کانی (به طور طبیعی جداسازی یا ساخته شده) وابسته به کانی که باید استفاده شود انجام شده است (راولینگز و جانسون، ۲۰۰۷). ممکن است که در آینده مجموعه‌های مشابهی نیز طراحی شوند که بتوانند تولید AMD را کنترل کرده یا مکان‌های آلوده را زیست‌پالایی کنند.

۱۳-۴- ریزجانداران استخراج زیستی و کاربردهای صنعتی آن‌ها

عملیات استخراج زیستی صنعتی بسته به نوع سنگ معدن و موقعیت جغرافیایی آن، مقدار فلز و کانی‌های ویژه موجود (اکسیدها و سولفیدهای فلزی از انواع متفاوت) چندین نوع هستند. یکی از بیشترین سامانه‌های استفاده شده برای بازیافت طلا یا مس فرایندهایی از نوع آبیاری است. این روش شامل نفوذ محلول‌های فروشویی از سنگ معدن خرد شده است که می‌تواند در یک ستون، یک پشته یا یک مکان دفن (ایستگاه انتقال) را در برگیرد (واتلینگ، ۲۰۰۶). در شکل ۱۳-۲، طرحی شماتیک ارائه شده است که در آن سنگ معدن خرد شده برای انجام فروشویی زیستی به یک مخزن انباشتگی یا ظروف استوانه‌ای شکل که اسیدی شده‌اند منتقل می‌شود. این یک فرایند کلیدی است، چرا که ذرات بزرگتر سنگ معدن توسط ذرات بسیار ریز که به آن‌ها می‌چسبند احاطه می‌شوند. بنابراین ذرات، به ویژه مواد ریز، در پایین مخزن ته‌نشین نمی‌شوند. در این روش، آبیاری و هوادهی پشته از بالا به پایین اتفاق می‌افتد و اجازه رشد یکنواخت‌تر ریزجانداران و بنابراین حلالیت فلزی بهتر را می‌دهد.

پشــته می‌تواند ۶ تا ۱۰ متر ارتفاع و ۱۰۰ متر یا بیشــتر طول و عرض داشــته باشــد، و روی آن نوارهای پلی‌اتیلن آبیاری با تراکم بالا قرار گرفته اســت تا جلوی از دســت رفتن محلول دارای مس گرفته شود. این محلولِ دارای سولفات مس که در نتیجه انحلال میکروبی سولفیدهای مس نامحلول موجود در ســنگ معدن تولید شــده اســت، در معرض استخراج حلال قرار می‌گیرد تا محلول غلیظ ســولفات مس به دســت آید. در ادامه فلز موجود در این محلول غلیظ در یک کارخانه اســتخراج الکتریکی [1] برای تولید مس الکترولیتی با خلوص بالا بازیافت می‌شــود (شــکل ۱۳-۲). از آن‌جا که بیشــتر عملیات اســتخراج معادن در مناطقی انجام می‌شــود که کمبودِ آب وجود دارد، آب برجای مانده از بازیابی فلز (عصاره آب‌شویی) دوباره برای آبیاری در پشته مورد استفاده قرار می‌گیرد.



شکل ۱۳-۲ طرح نشان دهنده پشته فروشویی زیستی کانی‌ها، یکی از معمول‌ترین تاسیسات (ساختارهای) استخراج زیستی صنعتی

1. Electro-winning plant

باکتری‌های فروشویی زیستی همچنین می‌توانند برای بازیافت طلا استفاده شوند (راولینگز، ۲۰۰۲). طلا معمولاً در طبیعت همراه با کانی‌های دارای آرسنیک و پیریت‌ها (آرسنوپیریت‌ها) یافت می‌شود. در طول فروشویی زیستی طلا، ریزجانداران اکسیدکننده گوگرد و آهن به آرسنوپیریت حمله کرده و آن را حل می‌کنند تا ذرات طلای به دام افتاده آزاد شوند. به دنبال این آزادسازی، طلا بر طبق روش‌های استخراج معدن طلا با سیانید کمپلکس می‌شود. به جای استفاده از پشته‌های فروشویی بزرگ یا مکان‌های دفن مانند آن‌چه که در فروشویی زیستی سنگ‌های معدن مس استفاده می‌شود، فروشویی زیستی طلا در مخازن راکتورهای زیستی که با هم‌زن هوادهی می‌شوند و به صورت سری به هم متصل هستند انجام می‌شود. از آن‌جا که ساخت این راکتورها گران است، در سنگ‌های معدن با خلوص بالا یا کنسانتره‌های معدنی از آن‌ها استفاده می‌شود. مزیت مخزن راکتورها در مقایسه با پشته‌ها و مکان‌های دفن که راکتورهای زیستی باز[1] هستند، این است که شرایط در مخازن می‌تواند کنترل شود. بنابراین سبب تسهیل فرایند استخراج سریع‌تر و کارآمدتر فلز می‌شود.

در حال حاضر، عملیاتی وجود دارند که در آن‌ها هم از ریزجانداران میانه‌دوست و هم از ریزجانداران گرمادوست استفاده می‌کنند (واتلینگ، ۲۰۰۶). استخراج زیستی دارای مزایای مشخصی نسبت به روش‌های استخراج مرسوم است. به عنوان مثال، به مقادیر زیاد انرژی در طول فرآوری و ذوب نیاز ندارد و نشر گازهای مضر مانند اکسید گوگرد را ایجاد نمی‌کند. با این وجود AMD می‌تواند تولید شود و اگر به درستی کنترل نشود، محیط را با اسید و فلزهای سمی آلوده می‌کند. استخراج زیستی یک مزیت بزرگ دیگر هم دارد و آن این است که نه تنها سنگ‌های معدن با عیار پایین که در روش‌های استاندارد استخراج معدن کنار گذاشته می‌شوند را می‌توان در یک روش اقتصادی عملی فروشویی کرد، بلکه برخی از سنگ‌های معدن با خلوص بالا را نیز می‌توان به این روش فروشویی کرد. در کشورهایی مانند شیلی، که در حال حاضر اولین تولیدکننده مس جهان است تعداد زیادی عملیات استخراج معدن از ۱۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ تن سنگ معدن در روز انجام می‌شود و با روش فروشویی زیستی پشته یا چاله‌ی کانی‌هایی مانند اکسیدها، کالکوسیت[2]، کوولیت[3]، کالکوپیریت[4] و غیره سالانه بین ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰۰ تن مس را تولید می‌کند. موارد مشابه در ایالات متحده، استرالیا و دیگر کشورها وجود دارد. موفق‌ترین موارد فرآوری اکسیدهای مس و سولفیدهای مس ثانویه بوده‌اند. البته کالکوپیریت فراوان‌ترین سولفید مس در جهان است. اما

1. Open bioreactors
2. Chalcocite
3. Covellite
4. Chalcopyrite

از آن‌جایی که انحلال آن به وسیله ریزجانداران بسیار مشکل است، تمایل بسیار زیادی به گسترش فرایندهای استخراج زیستی وجود دارد که عمدتاً مبتنی بر استفاده از ریزجانداران گرمادوست است (واتلینگ، ۲۰۰۶).

۱۳-۵- زیست‌پالایی محیطی AMD و فلزها با کاربرد ریزجانداران فروشویی زیستی

۱۳-۵-۱-روش‌های عمومی برای زیست‌پالایی AMD

همان‌طور که قبلا بحث شد، زمانی‌که اسیددوست‌ها گوگرد عنصری و گونه‌های گوگردی کاهش‌یافته مانند سولفیدها، سولفیت، پلی‌سولفیدها و چندین مورد دیگر را اکسید می‌کنند، اسید سولفوریک تولید می‌شود که محیط را تا مقادیر pH بین ۱ و ۲ اسیدی می‌کند (سوزوکی، ۱۹۹۹؛ رُوردِر و سَند، ۲۰۰۳). در نتیجه، این ریزجاندارن پیامد مهمی در محیط زیست دارند و با تولید اسید و فلزهای سمی که می‌توانند به شکل AMD به درون منابع آبی وارد شوند سبب آلودگی جدی می‌شوند. این آلودگی زیست‌محیطی می‌تواند در بسیاری از عملیات‌های فعال استخراج زیستی یا در مکان‌های معدن‌کاری متروکه و همچنین در طول فرایندهای زیست‌زمین‌شیمیایی طبیعی ایجاد شود. بنابراین نیاز مهمی به کنترل و بهینه‌سازی اکسیداسیون گوگرد وجود دارد (رُوردِر و سَند، ۲۰۰۷).

عوامل مهم تاثیرگذار بر تولید اسید شامل pH، اکسیژن در دسترس، فعالیت اکسید کننده شیمیایی Fe(III)، سطح ویژه بدون پوشش کانی و فعالیت باکتریایی است. پیامد زیست‌محیطی آن را می‌توان با جلوگیری از فرایند تولید اسید، مهار زه‌آب‌های اسیدی و جمع‌آوری و تیمار زه‌آب‌های خروجی کاهش داد (آکسل و کُلداس، ۲۰۰۶). AMD بایستی اصلاح شود یا کاهش یابد. اغلب مکان‌های آلوده مهر و موم می‌شوند یا موانعی برای جمع‌آوری مایعات اسیدی تعبیه می‌شود. در بیشتر فرآیندها از روش‌های پیشگیری برای جلوگیری از نشت بیشتر پساب‌های اسیدی در منطقه آلوده استفاده می‌شود. با تیمارهای شیمیایی مانند استفاده از اکسید کلسیم که pH اسیدی را خنثی می‌کند می‌توان آن را کنترل کرد. همچنین امکان مهار ریزجانداران اسیددوست مسئول تولید اسید نیز وجود دارد. این کار را می‌توان با کاربرد برخی از اسیدهای آلی، بنزوات سدیم، سدیم لوریل سولفات[1] یا ترکیب‌های آمونیوم چهار ظرفیتی[2] که بر رشد باکتری‌هایی مانند *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* موثرند انجام داد. انتخاب اینکه از کدام گزینه اصلاحی استفاده شود با عوامل اقتصادی و زیست محیطی تعیین می‌شود. درباره‌ی بیشتر روش‌های فعال و غیرفعال زیستی و غیرزیستی پالایش AMD بررسی‌هایی انجام شده که در دسترس هستند (جانسون و

1. Sodium lauryl sulfate
2. Quarternary ammonium compounds

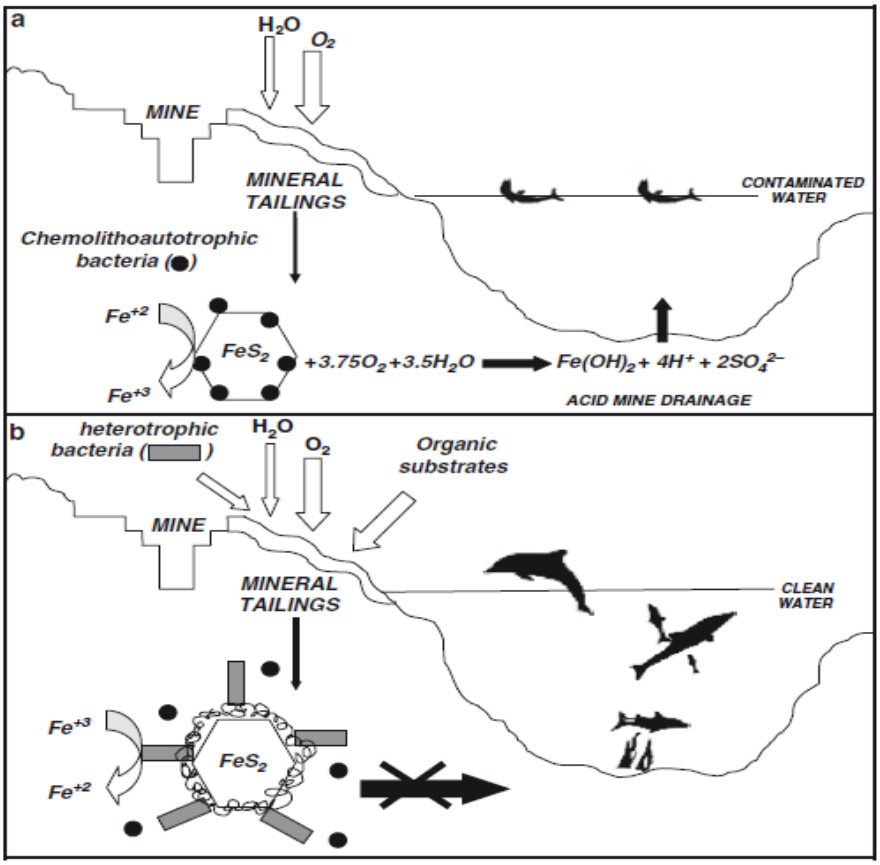
هالبرگ، ۲۰۰۵؛ آکسل و کُلداس، ۲۰۰۶). بنابراین در این‌جا تنها برخی از پیشرفت‌های اخیر در زمینه استفاده از ریزجانداران اسیددوست در زیست‌پالایی مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

۱۳-۵-۲- پوشش زیستی[1] برای جلوگیری از تولید AMD

به منظور به حداقل رساندن سطح ویژه کانی‌ها که در معرض حمله کمولیتواوتوتروف‌های اسیددوست است، روش جدیدی به نام پوشش زیستی پیشنهاد شده که برای حفاظت از بقایای کانی‌های سولفیدی بسیار واکنش‌پذیر است (جانسون و همکاران، ۲۰۰۸). ضایعات تازه خرد شده با باکتری‌های اسیددوست هتروتروف که در کاهش Fe(III) توانمند هستند، اشغال می‌شوند. این ریزجانداران روی سطوح واکنش‌پذیرکانی زیست‌لایه‌هایی را تشکیل داده و کانی را با EPS می‌پوشانند. در این روش، از اتصال (چسبیدن) اکسیدکننده‌های آهن به کانی جلوگیری می‌شود. شکل ۱۳-۳ طرح مصور این ایده را نشان می‌دهد.

آزمایش‌های اولیه نشان داده‌اند که انحلال کانی پیریت به روش پوشش زیستی با گونه‌های *اسیدی‌فیلیوم، اسیدوسلا*[2] *و گونه‌های اسیدوباکتریوم*[3]، در مقایسه با انحلال اکسیداتیو میکروبی، در حدود ۷۵-۵۷ درصد کاهش یافت (جانسون و همکاران، ۲۰۰۸). پوشش زیستی میدانی کانی‌های سولفیدی می‌تواند به آسانی و در زمین با افزودن سوبستراهای ارزان و کاربرد باکتری‌های اسیددوست هتروتروف کارآمد انجام شود.

1. Bioshrouding
2. *Acidocella*
3. *Acidobacterium* spp.



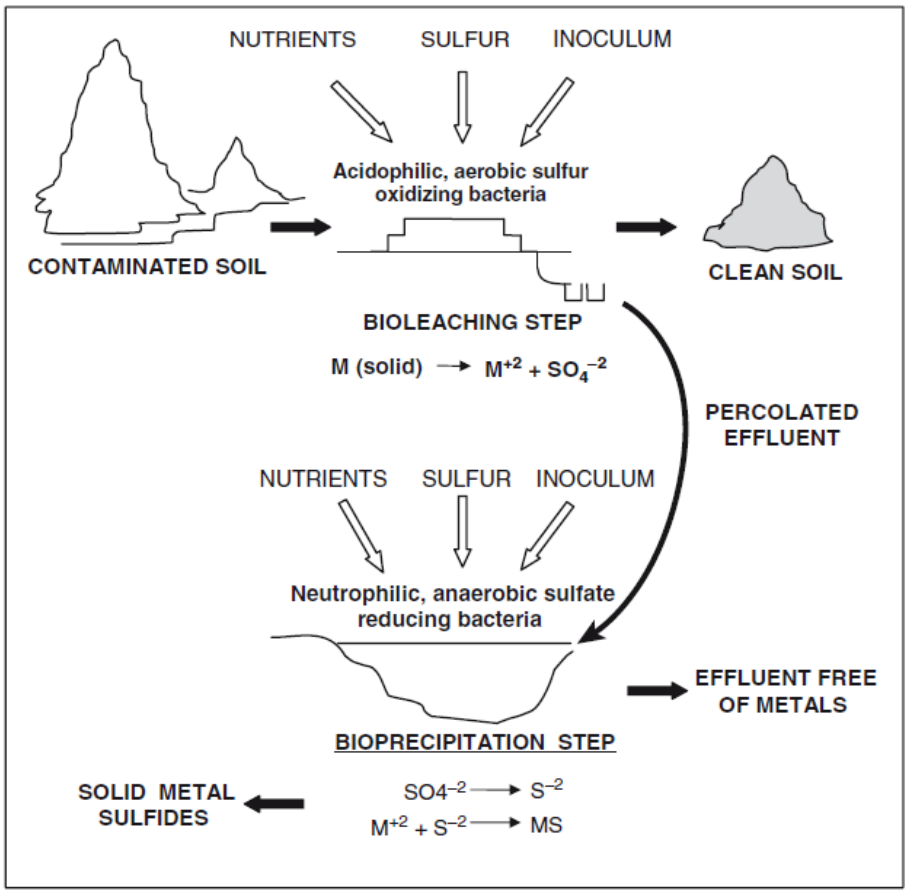
شکل ۱۳-۳ استفاده از پوشش زیستی برای حفاظت بقایای کانی واکنش‌پذیر به منظور جلوگیری از آلودگی با AMD. a) موقعیتی که در آن بقایای کانی دارای پیریت و دیگر سولفیدهای فلزی توسط کمولیتواوتوتروف‌های اسیددوست اکسیدکننده آهن، حل شده و اسید و فلزهای سمی تولید می‌شود و منابع آب مجاور را آلوده می‌کنند. b) مایه‌زنی کانی با باکتری‌های اسیددوست هتروتروف به همراه سوبستراهای آلی مناسب که جلوی اتصال اکسیدکننده‌های آهن به کانی‌ها را گرفته و تولید AMD آلاینده‌ی آب را تا اندازه‌ی زیادی کاهش داده یا متوقف می‌کند (برگرفته از جانسون و همکاران (۲۰۰۸)).

۱۳-۵-۳- زیست‌پالایی فلزهای سنگین

زیست‌پالایی یا حذف فلزهای سمی از خاک‌های آلوده می‌تواند به وسیله ترکیبی جالب توجه از دو فعالیت زیستی متضاد یعنی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد با یکی از ریزجانداران کاهنده سولفات حاصل شود. در گام اول، باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد،اسید سولفوریک تولید می‌کنند که فلزها را در فاز جامد خاک فروشویی یا حل می‌کند. سپس در گام دوم، فلزهای فروشویی شده در یک

راکتور زیستی توسط سولفید هیدروژن رسوب داده می‌شوند. سولفید هیدروژن در این راکتور توسط باکتری‌های کاهنده سولفات و در شرایط خنثی و بی‌هوازی از سولفیدهای فلزی نامحلول تولید می‌شوند (بارنز و همکاران، ۱۹۹۱؛ لوید و همکاران، ۲۰۰۵) (شکل ۱۳-۴). این فرایند با نام تجاری انحصاری Thiopaq ثبت شده است. آلاینده‌های فلزی مانند Cu، Cd، Ni و غیره می‌توانند به طور کارآمدی از خاک‌های آلوده فروشویی شوند. پساب‌های به دست آمده از چنین فرایندی به اندازه کافی از فلزها پاک‌سازی می‌شوند به طوری که می‌توانند در محیط دوباره مورد استفاده قرار گیرند (وایت و همکاران، ۱۹۹۸).

اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس برای حذف فلزهای مختلف از چندین منبع آلوده شده در مقیاس آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است. این پژوهش‌ها روش‌های نویدبخشی را برای اصلاح ضایعات مختلف صنعتی پیشنهاد می‌کنند. نمونه‌هایی از استفاده از این ریزجاندار برای زیست‌پالایی AMD وجود دارد. افزودن *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* به یک AMD طبیعی سینتیک رسوب فلز را حدود ۷۰ درصد افزایش داده و بنابراین حذف فلز را تسریع کرد (دارک‌واح و همکاران، ۲۰۰۵). جیوه از خاک‌های آلوده به جیوه و پساب‌ها با استفاده از یک گونه *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* مقاوم به جیوه تبخیر و بازیافت شد (تاکیوچی و سوگیو، ۲۰۰۶). همچنین حذف باکتریایی کروم (VI) و (III) از ضایعات آب‌کاری طبیعی گزارش شده است (کابررا و همکاران، ۲۰۰۷). این پژوهش‌گران در حدود ۹۳ درصد از کروم شش ظرفیتی را حذف کردند که نشان دهنده یک روش امیدوارکننده برای پالایش این نوع از ضایعات صنعتی است.



شکل ۱۳-۴ طرح کاربرد صنعتی یک فرایند پالایش خاک‌های آلوده به فلز

۱۳-۵-۴- زیست‌پالایی آرسنیک

آرسنیک یک آلاینده بسیار مهم در بسیاری از نقاط جهان است. آرسنیک یک شبه‌فلز به شدت سمی است که نه تنها بر محیط زیست بلکه بر سلامتی بشر نیز اثرگذار است. سازمان بهداشت جهانی آن را به عنوان یک سرطان‌زای قوی طبقه‌بندی کرده است. سمیت آن به سبب توانایی آرسنات به جایگزینی با فسفات در یاخته‌ها و آرسنیت برای عملکرد آن روی گروه‌های تیول پروتئین و ایجاد آسیب هم در پروتئین‌ها و هم در DNA است (نورمَن، ۱۹۹۸).

آرسنیک عمدتاً در پیِ استخراج معدن آرسنوپیریت‌ها به منظور استخراج طلا و دیگر فلزها سبب آلودگی منابع آبی می‌شود. همچنین موادی مانند حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌های دارای آرسنیک که توسط انسان ساخته می‌شوند، در ورود مواد سمی به مخازن آبی نقش دارند. به سبب

سـمیت زیاد آرسـنیک و محدودیت‌های قانونی سـخت‌گیرانه درباره‌ی حد مجاز آرسـنیک در منابع آبی، نیاز بیشتری به روش‌های کارآمد برای حذف این عنصر سمی وجود دارد.

روش‌های زیادی برای حذف آرسـنیک از آب‌های آلوده به کار گرفته می‌شود. این روش‌ها شامل جذب طبیعی، انعقاد و غیره هسـتند. چندین روش زیسـتی نیز برای زیسـت‌پالایی فلزها، به سـبب هزینه‌های پایین‌تر آن‌ها اجرا شده‌اند. چندین گونه از باکتری‌های هتروتروف متفاوت برای این هدف استفاده می‌شوند که در دیگر فصل‌های این کتاب می‌توان آن‌ها را یافت. به هر حال، تنها چند روش استخراج زیستی با ریزجانداران اسیددوست در این‌جا شرح داده خواهد شد.

فروشـویی زیستی آرسنوپیریت توسط *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* توضیح داده شده است (اِرلیچ، ۱۹۶۴؛ کولینـت و مورین، ۱۹۹۰). زیرا این بـاکتری بـه سـبب داشـتن ژن‌های مقاوم به آرسـنیـک در کروموزوم خود می‌تواند در برابر غلظت‌های بالای آرسـنیک مقاومت کند (بوتچر و همکاران، ۲۰۰۰). دوکِین و همکاران (۲۰۰۳) نشـان داده‌اند که *اسـیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* نه تنها به آرسـنیک بلکه به رسوب آن هم مقاوم است. یک سویه *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* به نام CC1 از پساب‌های بقایای سرشار از پیریت مملو از آرسنیک در یک معدن متروکه جداسازی شـده اسـت. این سویه توانست آرسنیک را در یک محیط مصنوعی مشخص و تنها هنگام رشد روی آهن دو ظرفیتی حذف کند ولی آرسنیت را به آرسنات اکسید نکرد. این جدایه به طور غیرمنتظره‌ای آرسنیک را به شکل آرسنیت و نه آرسنات و توسط آهن سه ظرفیتی تولید شده در مسیر متابولیسم انرژی خود رسـوب داد. به نظر می‌رسد که حذف آرسنیت توسط هم‌رسوبی با آهن سه ظرفیتی یک ویژگی مشترک در گونه‌های *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* باشد. بنابراین می‌توان از این ویژگی در حذف کارآمد آرسنیت از آب‌های شدیداً آلوده استفاده کرد (دوکِین و همکاران، ۲۰۰۳).

شمال شیلی منطقه معدن‌کاری فعال با غلظت‌های بالای هر دو نوع آرسنیک طبیعی و آرسنیک ناشـی از فعالیت‌های انسـانی اسـت. بنابراین در آن‌جا تمایل زیادی به کنترل و پالایش این آلودگی وجود دارد. برای کنترل AMD دارای سطوح بالای آرسنیک، ریزجاندارانی مانند *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسـیدانس* می‌توانند اسـتفاده شـوند. هنگامی‌که آرسـنوپیریت‌ها در حضـور آهن (III) پالایش می‌شوند، اسکرودیت[1] تولید می‌شود:

$$\mathrm{FeAsS} + 14\mathrm{Fe(III)} + 10\mathrm{H_2O} \rightarrow 14\mathrm{Fe(II)} + \mathrm{SO_4^{=}} + \mathrm{FeAsO_4.2H_2O} + 16\mathrm{H^+}$$

این واکنش توسط *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* کاتالیز می‌شود. زیرا این باکتری آهن (II) را به آهن (III) اکسید می‌کند. تشکیل اسکرودیت به این صورت است که ابتدا آرسنوپیریت در pH پایین اکسـید می‌شود و غلظت بالای آرسنات و فعالیت بالای آهن به طور موضعی تولید می‌کند که

1. Scorodite

در نتیجه سبب رسوب اسکرودیت می‌شود (داو و ریمستید، ۱۹۸۵). یک نمونه از کاربرد این واکنش ابتکاری است که فرایندی را برای حذف و ناپویاسازی آرسنیک از ضایعات دارای آرسنیک فراهم آورد (روتینبرگ و بیزمن، ۲۰۰۰). این ابتکار شامل اکسیداسیون آرسنیک به آرسنیک پنج ظرفیتی در یک محیط آبی توسط تماس آرسنیک (V) با آهن (III) برای تشکیل اسکرودیت نامحلول، و جداسازی ترکیب آهن- آرسنیک رسوب یافته از محلول آبی است. اکسیداسیون آرسنیک با استفاده از باکتری‌های کمولیتواتوتروف میانه‌دوست و گرمادوست گوناگون و آرکئاهای قادر به اکسیداسیون گوگرد و آهن (II) در pH بین ۰/۵ و ۴ و در دمای بین ۲۰ و ۹۰ درجه سلسیوس در حضور کاتالیست‌های معدنی مانند پیریت انجام می‌شود (روتینبرگ و بیزمن، ۲۰۰۰). این فرایند شامل راکتورها و مخازن گوناگونی است و ادعا می‌شود که بسیار ارزان‌تر از اکسیداسیون شیمیایی مرسوم در اتوکلاوهای اکسیژن‌دار در دمای ۹۰ درجه سلسیوس است.

۱۳-۵-۵- حس‌گرهای زیستی برای نظارت بر زیست‌پالایی آرسنیک و دیگر فلزها: کاربرد ساختارهای ژنتیکی مشتق شده از ریزجانداران استخراج زیستی

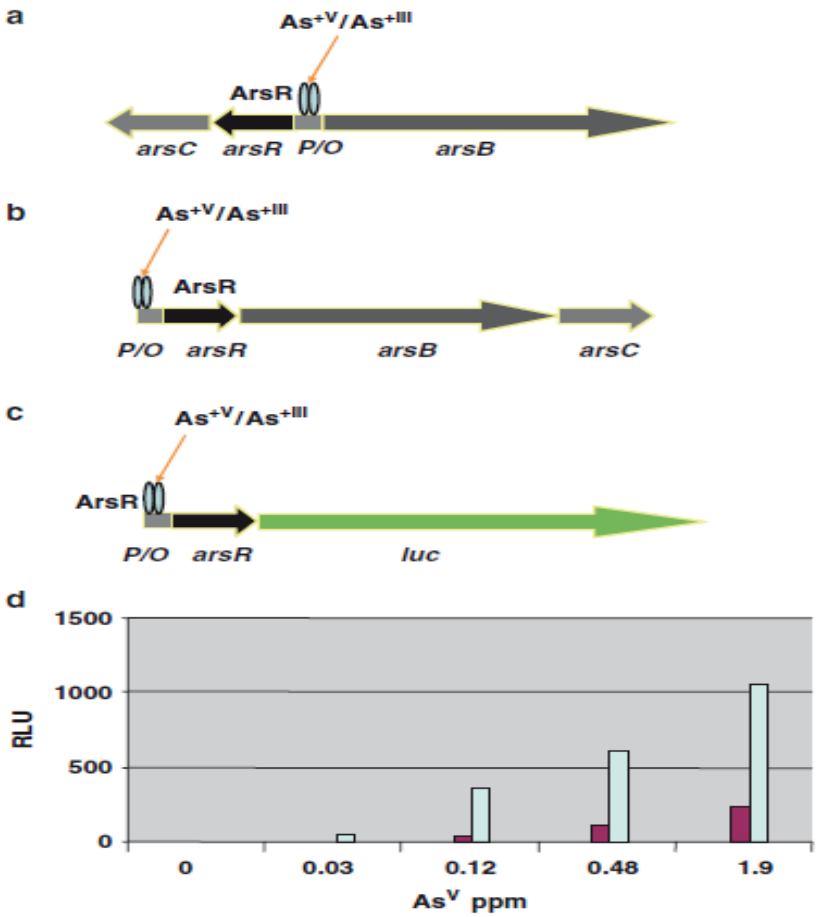
حس‌گرهای زیستی ابزاری هستند که یک جزء زیستی را برای تشخیص یک سیگنال مانند مقدار اندک از یک فلز در محلول مورد استفاده قرار می‌دهند. به طور کلی، آن‌ها مزایای زیادی از جمله تخصصی بودن، حساسیت، قابل حمل بودن و اندازه‌گیری بخش زیست فراهم را دارند (یاگی، ۲۰۰۷). البته معایب چندی نیز مانند طول عمر کوتاه، سمیت نمونه‌ها و سایر فاکتورها نیز وجود دارند که برای داشتن یک ابزار کاربردی با قابلیت استفاده‌ی میدانی بایستی این عیب‌ها برطرف شوند (هارمز و همکاران، ۲۰۰۶).

متداول‌ترین طراحی یک حس‌گر زیستی تک یاخته باکتریایی[1] است که در آن یک ساختار ژنتیکی نوترکیب متصل شده است. این ساختار شامل یک عنصر پاسخ دهنده برای تشخیص ماده شیمیایی (سیگنال برون یاخته‌ای) است و در نتیجه سبب بیان یک ژن گزارش‌گر می‌شود که در نتیجه غلظت محرک بیرونی سیگنال متناسب با آن را منتشر می‌کند. چند مورد از این حس‌گرهای زیستی برای تشخیص آرسنیک ساخته شده‌اند که در آن‌ها از یاخته دست‌کاری شده ژنتیکی *ای. کولای* استفاده شده است. این حس‌گرهای زیستی حساسیت‌های متفاوتی را در غلظت کمتر از ۵۰ میلی‌گرم آرسنیک در هر لیتر دارا هستند (جولیانی و همکاران، ۲۰۰۱؛ استوکر و همکارانف ۲۰۰۳؛ یاگی، ۲۰۰۷). سامانه مقاومت به آرسنیک در *ای. کولای* از اُپرون ars دارای ژن‌های تنظیمی *arsR* و *arsD* و ژن‌های ساختاری *arsA*، *arsB* و *arsC* تشکیل می‌شود (وو و رُزن، ۱۹۹۱؛ کایور و رُزن،

1. Whole-cell bacterial biosensor

۱۹۹۲). در شکل ۱۳-۵ یک نمونه از کاربرد برخی از این ژن‌ها برای ساختن یک حس‌گر زیستی *ای. کولای* آمده است (جولیانی و همکاران، ۲۰۰۱). بازدارنده *ArsR* به ناحیه پروموتر/ اُپراتور (P/O) اُپرون ars متصل می‌شود و رونویسی ژن‌های مرتبط با مقاومت به آرسنیک را مهار می‌کند (ژن‌های *arsB* و *arsC* نمونه‌هایی از این بازدارنده‌ها هستند که در شکل نشان داده شده است). هنگامی‌که آرسنیک (V) و آرسنیک (III) در محیط باشند، به *ArsR* متصل شده و آن را از DNA جدا می‌کنند که در این صورت ژن(های) پایین‌دست بیان می‌شوند. اگر این ژن‌ها توسط یک ژن گزارش‌گر مانند *luc* از واکنش لوسیفراز تابش‌گر جایگزین شوند، در حضور آرسنیک، یک سیگنال نوری می‌تواند به وسیله دستگاه لومینومتر[1] اندازه‌گیری شود. این سیگنال به نوبه خود با غلظت آرسنیک موجود در نمونه متناسب خواهد بود. هنگامی‌که این ساختار با استفاده از عناصر ژنتیکی اُپرون ars *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* انجام شد (شکل ۱۳d-۵)، افزایشی چند برابری در شدت سیگنال به دست آمد (جولیانی و جرز، نتایج منتشر نشده). این یافته‌ها امیدوارکننده هستند و با کنترل متغیرهایی مانند استفاده از یاخته‌هایی که در شرایط کمبود فسفات رشد کرده باشند، می‌توان این روش را ارتقا داد. یاخته‌های این‌چنینی حساسیت بالایی به آرسنیک پیدا می‌کنند و برای ساخت حس‌گرهای زیستی حساس برای تعیین آرسنیک در آب آشامیدنی مناسب خواهند بود.

1. Luminometer



شکل ۱۳-۵ ساخت یک حس‌گر زیستی برای تشخیص و پایش آرسنیک در آب آشامیدنی آلوده. **a**) زمینه ژنومی برخی از ژن‌های *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* **ATCC 33020** درگیر در مقاومت به آرسنیک (بوتچر و همکاران، ۲۰۰۰). **b**) بخشی از اُپرون ***ars*** در *ای. کولای* (زو و رُزن، ۱۹۹۷). **c**) یک ساختار ژنتیکی که در آن ژن گزارش‌گر ***luc*** تحت کنترل پروموتر ***ars*** *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* است. **d**) واحدهای نشر نسبی نور[1] (**RLU**) از یک حس‌گر زیستی یاخته‌ای *ای. کولای*، موردی با ساختار ژنتیکی **c** (ستون بی‌رنگ) و ساختار مشابه که در آن عناصر ژنتیکی مقاوم به آرسنیک *ای. کولای* استفاده شدند (ستون رنگی) نشان داده شده است. شدت نور *ای. کولای* شاهد که تنها دارای پلاسمید استفاده شده برای حمل ساختار ژنتیکی بود نیز اندازه‌گیری شد که نور قابل تشخیصی نداشت.

1. Relative light emission

۱۳-۵-۶- بازیافت ضایعات فلزها برای جلوگیری از آلودگی زیست محیطی

ریزجانداران فروشویی زیستی مانند *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* همچنین می‌توانند کاربردهای دیگری برای کمک به جلوگیری از آلودگی فلزی در جوامع امروزی داشته باشند. به عنوان مثال، از این باکتری به طور موفقیت‌آمیزی برای بازیافت فلزهایی مانند کادمیوم از باتری‌های مصرف شده استفاده شده است. با کاربرد راکتورهای زیستی، *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* در تماس با گوگرد عنصری رشد کرده است. باکتری‌ها در پیِ اکسایش گوگرد اسید سولفوریک تولید می‌کنند و از این اسید برای انحلال غیرمستقیم باتری‌های کادمیوم- نیکل مصرف شده استفاده شد و سبب بازیافت ۱۰۰-۹۰ درصد از کادمیوم، نیکل و آهن پس از ۹۳ روز شد (سروتی و همکاران، ۱۹۹۸). فروشویی زیستی باتری‌های قابل شارژ لیتیومی مصرف شده، که دارای لیتیوم و کبالت است نیز با استفاده از *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* بررسی شده است (میشرا و همکاران، ۲۰۰۸). این نویسندگان نتیجه گرفتند که امکان استفاده از اسید تولید شده در طول رشد باکتری در حضور گوگرد و آهن برای بازیافت فلزهای ارزشمند وجود دارد. روش مشابهی برای پالایش یک کاتالیست نیکل مصرف شده با استفاده از *اسیدی‌تیوباسیلوس تیواکسیدانس* انجام شد و نیکل از پساب آن به روش رسوب فلز با سولفید تولید شده *توسط* یاخته‌های *دسولفوویبریو* بازیافت شد (بوسیو و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین بازیافت میکروبی مس از مدارهای چاپی ضایعات رایانه‌ها توسط *اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس* به انجام رسید (چوی و همکاران، ۲۰۰۴). این رویکردها نه تنها از نظر اقتصادی ارزشمند هستند بلکه ممکن است روش‌های موثری برای بازیافت مواد فراوان مصرف شده و دور انداخته شده‌ی دارای فلز باشند و بدین گونه سبب جلوگیری از بسیاری از مشکلات آلودگی زیست محیطی شوند.

۱۳-۶- نتیجه‌گیری

انحلال میکروبی فلزها در محیط اسیدی به طور موفقیت‌آمیزی در فرایندهای صنعتی استفاده می‌شوند که به آن فروشویی سنگ‌های معدنی یا استخراج زیستی گفته شده و برای استخراج فلزهایی مانند مس، طلا، اورانیوم و غیره به کار گرفته می‌شود. از دیگر سوی، ریزجانداران اسیددوست فلزها را پویا کرده و AMD تولید می‌کنند، که سبب مشکلات زیست محیطی جدی می‌شود. با این حال با استفاده از ویژگی‌های خاص ریزجانداران اسیددوست و دیگر ریزجانداران مرتبط با فلزها، می‌توان به زیست‌پالایی یا حذف فلزهای سمی از خاک‌های آلوده دست یافت. انتخاب گزینه زیست‌پالایی برای استفاده توسط عوامل مختلف محیطی و اقتصادی تعیین می‌شود.

روش‌های کنونی مطالعه ریزجانداران، ریزجاندار یا مجموعه آن‌ها را به صورت یک اجتماع درنظر می‌گیرد و با یکپارچه‌سازی دانش زیستی پایه با ژنومیک، پروتئومیک، متابولومیک[1]، و دیگر داده‌ها سعی در رسیدن به تصویری کلی از چگونگی عملکرد جوامع یا یاخته‌های میکروبی دارد. این دانش جدید نه تنها درک ما را از پدیده‌های میکروبیولوژی افزایش می‌دهد، بلکه همچنین سبب بهبود زیست‌فناوری‌های میکروبی کاربردی از جمله استخراج زیستی و زیست‌پالایی فلزها در محیط‌های اسیدی می‌شود.

1. Metabolomics

منابع

Akcil A, Koldas S (2006) Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies. J Clean Prod 14:1139–1145.

Alvarez S, Jerez CA (2004) Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in Acidithiobacillus ferrooxidans. Appl Environ Microbiol 70:5177–5182.

Barnes LJ, Janssen FJ, Sherren J, Versteegh JH, Koch RO, Scheeren PJH (1991) A new process for the microbial removal of sulphate and heavy metal from contaminated waters extracted by a geohydrological control system. Chem Eng Res Des 69A:184–186.

Bosio V, Viera M, Donati E (2007) Integrated bacterial process for the treatment of a spent nickel catalyst. J Hazard Mater 154:804–810.

Bruscella P, Appia-Ayme C, Levicán G, Ratouchniak J, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V (2007) Differential expression of two bc1 complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium Acidithiobacillus ferrooxidans suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. Microbiology 153:102–110.

Butcher BG, Deane SM, Rawlings DE (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of Thiobacillus ferrooxidans have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 66:1826–1833.

Cabrera G, Viera M, Gómez JM, Cantero D, Donati D (2007) Bacterial removal of chromium (VI) and (III) in a continuous system. Biodegradation 18:505–513.

Cerruti C, Curutchet G, Donati E (1998) Bio-dissolution of spent nickel–cadmium batteries using Thiobacillus ferrooxidans. J Biotechnol 62:209–219.

Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey AJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA (2007) Periplasmic proteins of the extremophile Acidithiobacillus ferrooxidans: a high throughput proteomic analysis. Mol Cell Proteomics 6:2239–2251.

Choi MS, Cho KS, Kim DS, Kim DJ (2004) Microbial recovery of copper from printed circuit boards of waste computer by Acidithiobacillus ferrooxidans. J Environ Sci Health A Tox Subst Environ Eng 39:2973–2982.

Collinet MN, Morin D (1990) Characterization of arsenopyrite oxidizing Thiobacillus. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron. Anton van Leeuwenh 57:237–244.

Darkwah L, Rowson NA, Hewitt CJ (2005) Laboratory scale bioremediation of acid mine water drainage from a disused tin mine. Biotechnol Lett 17:1251–1257.

Das A, Modak JM, Natarajan KA (1998) Surface chemical studies of Thiobacillus ferrooxidans with reference to copper tolerance. Anton van Leeuwenh 73:215–222.

Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi PR, Bond PL (2003) Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. Microbiology 149:1959–1970.

Dove PM, Rimstidt JD (1985) The solubility and stability of scorodite, FeAsO4• 2H2O. Am Mineralog 70:838–844.

Duquesne K, Lebrun S, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Morin G, Bonnefoy V (2003) Immobilization of arsenite and ferric iron by Acidithiobacillus ferrooxidans and its relevance to acid mine drainage. Appl Environ Microbiol 69:6165–6173.

Ehrlich HL (1964) Bacterial oxidation of arsenopyrite and enargite. Econ Geol 59:1306–1312.

Guiliani N, Casanova A, Demergasso C, Jerez CA (2001) Bacterial biosensor for arsenic biomonitoring: applications in Northern Chile. Biol Res 34:R–126.

Hallberg KB, Johnson DB (2001) Biodiversity of acidophilic prokaryotes. Adv Appl Microbiol 49:37–84.

Handelsman J (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 68:669–685.

Harms H, Wells MC, van der Meer JR (2006) Whole-cell living biosensors — are they ready for environmental application? Appl Microbiol Biotechnol 70:273–280.

Jerez CA (2008) The use of genomics, proteomics and other OMIC technologies for the global understanding of biomining microorganisms. Hydrometallurgy 94:162–169.

Johnson DB, Hallberg KB (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. Sci Total Environ 338:3–14.

Johnson DB, Yajie L, Okibe N (2008) “Bioshrouding”: a novel approach for securing reactive mineral tailings. Biotechnol Lett 30:445–449

Kaur P, Rosen BP (1992) Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. Plasmid 27:29–40.

Kelly DP, Shergill JK, Lu W-P, Wood AP (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. Anton van Leeuwenh 71:95–107.

Lloyd JR, Anderson RT, Macaskie LE (2005) Bioremediation of metals and radionuclids. In: Atlas RM, Philp J (eds) Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. ASM Press, Washington DC, pp 293–317.

Lo I, Denef VJ, VerBerkmoes NC, Shah MB, Goltsman D, DiBartolo G, Tyson GW, Allen EE, Ram RJ, Detter JC, Richardson P, Thelen MP, Hettich RL, Banfield JF (2007) Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. Nature 446:537–541.

Lundgren DG (1980) Ore leaching by bacteria. Annu Rev Microbiol 34:263–283.

Mishra D, Kim DJ, Ralph DE, Ahn JG, Rhee YH (2008) Bioleaching of metals from spent lithium ion secondary batteries using Acidithiobacillus ferrooxidans. Waste Manage 28:333–338.

Müller FH, Bandeiras TM, Urich T, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A (2004) Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. Mol Microbiol 53:1147–1160.

Norman NC (1998) Chemistry of arsenic, antimony and bismuth. J Natl Cancer Inst 40:453–463.

Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL (2003) Bioleaching review, Part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. Appl Microbiol Biotechnol 63:249–257.

Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV (2001) The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli. J Biol Chem 276:30670–30677.

Puig S, Rees EM, Thiele DJ (2002) The ABCDs of periplasmic copper trafficking. Structure 10:1292–1295.

Quatrini R, Lefimil C, Veloso FA, Pedroso I, Holmes DS, Jedlicki E (2007) Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans. Nucleic Acids Res 35:2153–2166.

Quatrini R, Appia-Ayme C, Dennis Y, Ratouchniak J, Veloso F, Valdes J, Lefimil C, Silver S.

Roberto F, Orellana O, Denizot F, Jedlicki E, Holmes D, Bonnefoy V (2006) Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of Acidithiobacillus ferrooxidans by microarray transcriptome profiling. Hydrometallurgy 83:263–272.

Ram RJ, VerBerkmoes NC, Thelen MP, Tyson GW, Baker BJ, Blake II RC, Shah M, Hettich RL, Banfield JF (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. Science 308:1915–1920.

Ramirez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S, Jerez CA (2004) Differential protein expression during growth of Acidithiobacillus ferrooxidans on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. Appl Environ Microbiol 70:4491–4498.

Rawlings DE (2002) Heavy metal mining using microbes. Annu Rev Microbiol 56:65–91.

Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. Microb Cell Fact 4:13.

Rawlings DE, Johnson DB (2007) The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. Microbiology 153:315–324.

Remonsellez F, Orell A, Jerez CA (2006) Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus metallicus: possible role of polyphosphate metabolism. Microbiology 152:59–66.

Rohwerder T, Sand W (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfuroxidizing enzymes from Acidithiobacillus and Acidiphilium spp. Microbiology 149:1699–1709.

Rohwerder T, Sand W (2007) Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. Eng Life Sci 7:301–309.

Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Appl Microbiol Biotechnol 63:239–248.

Ruitenberg R, Buisman CJN (2000) Process for immobilizing arsenic waste. WO/2000/078402.

Ruiz LM, Valenzuela S, Castro M, Gonzalez A, Frezza M, Soulère L, Rohwerder T, Queneau Y, Doutheau A, Sand CW, Jerez CA, Guiliani N (2008) AHL communication is a widespread

phenomenon in biomining bacteria species and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. Hydrometallurgy 94:133–137.

Schippers A (2007) Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. In: Donati ER, Sand W (eds) Microbial processing of metal sulfides. Springer, Berlin, pp 3–33.

Schippers A, Sand W (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl Environ Microbiol 65:319–321.

Silver M, Lundgren DG (1968) Sulfur-oxidizing enzyme of Ferrobacillus ferrooxidans (Thiobacillus ferrooxidans). Can J Biochem 46:457–461.

Stocker J, Balluch D, Gsell M, Harms H, Feliciano J, Daunert S, Malik KA, van der Meer JR (2003) Development of a set of simple bacterial sensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environ Sci Technol 37:4743–4750.

Streit WR, Schmitz RA (2005) Metagenomics — the key to the uncultured microbes. Curr Opin Microbiol 7:492–498.

Sugio T, Katagiri T, Moriyama M, Zhèn YL, Inagaki K, Tano T (1987) Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in Thiobacillus ferrooxidans. Appl Environ Microbiol 54:153–157.

Suzuki I (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. Can J Microbiol 45:97–105.

Suzuki I (2001) Microbial leaching of metals from sulfide minerals. Biotechnol Adv 19:119–132.

Takeuchi F, Sugio T (2006) Volatilization and recovery of mercury from mercury-polluted soils and wastewaters using mercury-resistant Acidithiobacillus ferrooxidans strains SUG 2-2 and MON-1. Environ Sci 13:305–316.

Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature 428:37–43.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA (2006) Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. Biotechnol Adv 24:197–211.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA (2007) Differential-expression proteomics for the study of sulfur metabolism in the chemolithoautotrophic Acidithiobacillus ferrooxidans. In: Friedrich C, Dahl C (eds) Microbial sulfur metabolism. Springer, Berlin, pp 77–86.

Vera M, Pagliai F, Guiliani N, Jerez CA (2008) The chemolithoautotroph Acidithiobacillus ferrooxidans can survive under phosphate-limiting conditions by the expression of a C-P lyase operon allowing it to grow in phosphonates. Appl Environ Microbiol 74:1829–1835.

Watling HR (2006) The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — a review. Hydrometallurgy 84:81–108

White CA, Sharman AK, Gadd GM (1998) An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. Nat Biotechnol 16:572–575.

Wu J, Rosen BP (1991) The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. Mol Microbiol 5:1331–1336.

Xu C, Rosen BP (1997) Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of Escherichia coli. J Biol Chem 272:15734–15738.

Yagi K (2007) Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. Appl Microbiol Biotechnol 73:1251–1258.

Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V (2004) Regulation of the expression of the Acidithiobacillus ferrooxidans rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. Microbiology 150:2113–2123.

فصل چهاردهم

پیشرفت‌ها در گیاه‌پالایی و ریشه‌پالایی

Tomas Macek, Ondrej Uhlik, Katerina Jecna, Martina Novakova, Petra Lovecka, Jan Rezek, Vlasta Dudkova, Petr Stursa, Blanka Vrchotova, Daniela Pavlikova, Katerina Demnerova, and Martina Mackova

۱۴-۱- مقدمه

با افزایش سطح توجهات به سامانه‌های پالایش زیستی، نقشی که گیاهان در این فرایند بازی می‌کنند را نمی‌توان در کتابی که در این زمینه جامع باشد، در نظر نگرفت. بیشتر مشکلاتی که در زمینه آلودگی زیست محیطی وجود دارند، می‌توانند راه حل گیاهی[1] داشته باشند و با کمک گیاهان برطرف شوند (مک‌کوچئون و اشنور، ۲۰۰۳؛ ماکوآ و همکاران، ۲۰۰۶). گیاه‌پالایی تنها وابسته به عمل‌کرد گیاه نیست و بایستی همیشه به همراه پیامد ریزجانداران رایزوسفری در نظر گرفته شود (ریتمن، ۲۰۰۶؛ ماکوآ و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه گیاهان توانایی ذاتی برای سمیت‌زداییِ برخی مواد زیست‌بیگانه را دارند (یعنی آن‌ها را برای گیاه غیرسمی می‌کنند)، اما برخلاف ریزجانداران، گیاهان ساز و کار موردنیاز برای تجزیه کامل ترکیب‌های سمی را ندارند (ایپن و همکاران، ۲۰۰۷). گیاهان معمولاً از آنزیم‌ها و مسیرهایی استفاده می‌کنند که در پستانداران هم وجود دارد و منجر به ابداع مفهوم کبد سبز[2] شده اند (ساندرمن، ۱۹۹۴). اما به عنوان موجودات اتوتروف، گیاهان از ترکیب‌های آلی برای متابولیسم انرژی و کربن استفاده نمی‌کنند (ون‌آکن، ۲۰۰۸). در نتیجه، معمولاً گیاهان متابولیسم آنزیمی موردنیاز برای معدنی کردن کامل مولکول‌های آلی را ندارند که سبب انباشت متابولیت‌های سمی شده (ایپن و همکاران، ۲۰۰۷) و بعداً می‌توانند به محیط آزاد شوند.

گیاهان با جذب مستقیم آلاینده‌ها از خاک (که به طور خلاصه در اشنور و همکاران، (۱۹۹۵) آمده است) و در ادامه تغییر شکل و انتقال، آن‌ها را به شکل غیرسمی برای خود درمی‌آورند که الزاماً به معنی غیرسمی شدن این آلاینده‌ها برای انسان نیست. اگر واکنش‌های دگرگونی زیستی سبب کاهش سمیت یک ترکیب زیست‌بیگانه شود به آن واکنش سمیت‌زدایی گفته می‌شود. در برخی موارد این گونه واکنش‌ها به افزایش سمیت ترکیب‌ها هم منجر می‌شوند که در مورد ترکیب‌های آلی بیشتر رخ می‌دهد. این امر می‌تواند در نتیجه‌ی دگرگونی یک ترکیب با تجزیه شوندگی سخت به ترکیبی با تجزیه‌شوندگی ساده رخ دهد. بنابراین ترکیبی با سمیت یا حلالیت بیشتر که تشکیل شده است، در مراحل بعدی می‌تواند بی‌خطر باشد. استفاده از گیاهان برای دگرگونی، انباشت و حذف آلاینده‌ها از محیط یا حداقل کاهش متابولیت‌های آن‌ها به مدت بیش از یک دهه بحث شده است (اشنور و همکاران، ۱۹۹۵؛ کانینگهام و همکاران، ۱۹۹۵؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۴). از این روش برای حذف زیست‌بیگانه‌ها و آلاینده‌های آلی و معدنی خاک، آب و هوا می‌توان استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین هدف‌ها جلوگیری از مهاجرت آلاینده‌ها به

1. Phyto-solution
2. Green liver

جایگاه‌هایی است که خطر بیشتری برای سلامتی انسان دارند (سالت و همکاران، ۱۹۹۵). آلاینده‌ها از کودهـای معدنی تا آفت‌کش‌ها، فلزهای سـنگین تا عناصـر رادیواکتیو و کمیاب تا مواد منفجره (فرنچ و همکاران، ۱۹۹۹) و مواد نفتی تا سـلاح‌های شـیمیایی (ماسـک و همکاران، ۱۹۹۸، ۱۹۹۹) متغیر هسـتند. مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز مانند تری‌بوتیل قلع، بیسـفنول A یا نونیل فنول‌ها (بوک و همکاران، ۲۰۰۲) و همین‌طور ترکیب‌های آلی با تجزیه‌شـوندگی سـخت مانند PCB ها یا PAH ها بیشـتر در کانون توجه هستند. پالایش علف‌کش‌های کلرواستانیلید[1] و حذف مواد منفجره هم توسـط مزاری و همکاران (۲۰۰۵) مطالعه شـده اسـت. مقایسـه در مقیاس بزرگ روی فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسـفراز در گیاهان جاهای مختلف اروپا (شـرودر و همکاران، ۲۰۰۸) فاز دومی از سمیت‌زدایی در گیاهان را آشکار کرد که هم‌جوشی ترکیب‌های فعال شده نامیده می‌شود. اخیراً این مورد در منابع به صورت خلاصه آمده است (مک‌کوچئون و اشنور، ۲۰۰۳؛ ماکوآ و همکاران، ۲۰۰۶).

برداشـت گیاهان یک روش آشنا در کشاورزی است اما بیشتر گیاهانی که زیست توده بالا دارند معمولاً مقادیر کمی از آلاینده‌ها را انباشت می‌کنند و برای پاک‌سازی خاک آلوده اقتصادی نیستند. یافتن یا توسـعه گیاهانی که سـطح بالایی از آلاینده‌های فلزی را در بافت‌های قابل برداشت انباشته می‌کنند امکان‌پذیر نبود تا این‌که گروه کوچکی از گیاهان بنام بیش‌اندوزها[2] شـناسـایی شـدند. این گیاهان نسـبتاً معروف نیسـتند اما در قلمرو گیاهان وجود دارند و می‌توانند مقدار شـگفت‌انگیزی از برخی فلزها را انباشـت کنند (برون و همکاران، ۱۹۹۵) که احتمالاً سـاز و کار جذب آن‌ها همانند جذب فلزهای ضـروری برای فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها اسـت. گیاهان سـامانه‌های ویژه خود را برای اتصـال به فلزهای سنگین دارند که بیشتر مبتنی بر ساخت فایتوکلاتین‌ها[3] است (گریل و همکاران، ۱۹۸۹) اتصـال فلزهـای سـنگین در گیـاهـان بـه طور معمول بـا پپتیـدهـا، فـایتوکلاتین‌هـا و فایتوسـیدروفورهای[4] گوناگون انجام می‌شـود (کوتربا و همکاران، ۱۹۹۹؛ مجاره و بولو، ۲۰۰۱). پس از مطالعه نیکوتیان‌آمین توسـط رودولف و همکاران (۱۹۸۵) مشـخص شـد که فایتوسیدروفورها در همه گیاهان وجود دارند.

حدود ۴۰۰ گونه گیاهی شـناخته شـده‌اند که بیش‌اندوز فلزهای سـنگین هستند و بیشتر آن‌ها نیکل را انباشـت می‌کنند (بیکر و همکاران، ۱۹۹۴). متاسـفانه بیشتر بیش‌اندوزها زیست توده کمی تولید می‌کنند و همین امر دلیل این اسـت که فرایند گیاه‌پالایی به خوبی مطالعه نشـده اسـت. فرایندهای درگیر در بیش‌اندوزی به خوبی روشـن نیسـتند اما تلاش‌هایی برای افزایش انباشـت

1. Chloroacetanilide
2. Hyperaccumulators
3. Phytochelatins
4. Phytosiderophores

فلزهای سنگین در گیاهانی که زیست توده بالا تولید می‌کنند انجام گرفته است (ماسم و همکاران، ۱۹۹۶؛ کرامر و چاردوننس، ۲۰۰۱؛ کلمنتس و همکاران، ۲۰۰۲).

در طی انباشت فلزهای سنگین و همچنین حذف آلاینده‌های آلی در مقیاس وسیع و توسط گیاهان، مهم‌ترین عامل محدودکننده زمان طولانی موردنیاز برای آلودگی‌زدایی خاک است. با این وجود استخراج گیاهی فلزها به دلیل اندازه و دامنه مسائل زیست‌محیطی مرتبط با خاک‌های آلوده به فلزها و رقابت ترجیحی فناوری‌های مبتنی بر گیاهان، فرصت اقتصادی زیادی را فراهم کرده است (چانی و همکاران، ۱۹۹۷). به ویژه گیاهانی که قادر به حذف بیش از یک آلاینده هستند، در این زمینه بسیار مهم هستند. زیرا معمولاً درجای آلوده بیش از یک ترکیب سمی وجود دارد. بیشتر آلاینده‌های عنصری از راه سامانه انتقال پایه که برای جذب عناصر غذایی هستند، وارد گیاهان می‌شوند. بنابراین برخی از مواد زیست‌بیگانه در واکوئل‌ها انباشته می‌شوند که یک فرایند حفاظت از گیاه در برابر پیامدهای سمی آن‌ها است.

برای تبدیل آلاینده‌ها به ترکیب‌های بی‌ضرر، همچنین نیاز است که بدانیم چه فرآورده‌هایی تشکیل شده‌اند و همین‌طور سمیت آن‌ها برای گیاهان، جانوران وانسان چگونه است و چگونه این ترکیب‌ها در ادامه توسط ریزجانداران خاک متابولیزه می‌شوند (ماسک و همکاران، ۲۰۰۲). زیرا آن‌ها پس از جذب توسط گیاهان با ریزش برگ‌ها و پوسیدن چوب دوباره در محیط رها می‌شوند. در این زمینه PCB ها را می‌توان مثال زد. زیرا برخی فرآورده‌های تجزیه آن‌ها توسط گیاهان شناسایی شده (رزاک و همکاران، ۲۰۰۷، ۲۰۰۸) و می‌توانند توسط ریزجانداران خاک بیشتر متابولیزه شوند (فرانکوا و همکاران، ۲۰۰۱، ۲۰۰۴).

گیاهان مرسوم (گراس‌ها، آفتاب‌گردان، ذرت، شاهدانه، کتان، یونجه، تنباکو، بید، خردل هندی، صنوبر و ...) ظرفیت خوبی برای گیاه‌پالایی نشان داده‌اند. به ویژه برای حذف آلاینده‌ها در مقیاس بزرگ که دارای غلظت کمِ مواد ناخواسته هستند یعنی جاهایی که استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی مرسوم در آن‌ها مقرون به صرفه نیست، استفاده از این گیاهان مناسب است. مهم‌ترین پارامتر برای انتخاب گیاه مناسب تحمل گیاه دربرابر فلزهای سنگین نیست بلکه کارایی آن در انباشت فلزهای سنگین است. افزون بر گنجایش انباشت، برای تعیین کل جذب فلز، تولید زیست توده گیاهی نیز بایستی در نظر گرفته شود (تلوستوس و همکاران، ۲۰۰۶). به نظر می‌رسد که در آب آلوده دامنه گسترده‌ای از موجودات، از گیاهان آب‌زی تا جلبک‌های ریز، و از فیلترهای ریشه تا باکتری‌های تثبیت شده، امیدبخش باشند. استفاده از گیاهان در آلودگی‌زدایی لجن فاضلاب دارای فلزهای سنگین توسط توماژفسکی و همکاران (۲۰۰۶) بررسی شده است. فعالیت‌های آزمایشگاهی انجام گرفته در این زمینه (وانک و شوایتزگوبل، ۲۰۰۳) نشان می‌دهد که اخیراً چقدر برای سود رساندن به محیط از طریق فن‌آوری زیستی گیاهی تلاش‌های زیادی صورت پذیرفته است.

به طور کلی آلاینده بایستی از نظر زیستی در دسترس بوده و توسط ریشه قابل جذب باشد. جابه‌جایی آلاینده از ریشه به ساقه برداشت آن را آسان‌تر می‌کند. حجم یا وزن زیست توده برداشت شده را می‌توان با کمپوست کردن، هضم بی‌هوازی، سوزاندن در دمای پایین و خرد کردن،کم کرد و از این راه هزینه‌های مدیریت و جابه‌جایی را کاهش داد (سالت و همکاران، ۱۹۹۵). پس از پایدار کردن آن، امکان دفن کردن زیست توده را می‌توان بررسی کرد. در مورد برخی فلزها (مانند نیکل، مس و روی)، پس از خرد کردن و ذوب در کوره، ارزش فلزی که می‌توان بازیابی کرد، محرکی برای پالایش و استخراج آن است. این کار تولید زباله خطرناک را کم کرده و بازیابی را سودآور می‌کند (ندلکوسکا و دوران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۲).

در منابع اطلاعات زیادی درباره افزایش بیان ژن‌های موجود یا وارد کردن ژن‌های پستانداران و باکتری‌ها به گیاهان در راستای افزایش توان طبیعی گیاهان برای مقابله با مواد زیست‌بیگانه وجود دارد (راسکین، ۱۹۹۶؛ پیلون اسمیتس و پیلون، ۲۰۰۲؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۶). گیاهان تراریخت[1] مفید برای محیط زیست به طور معمول شامل گیاهانی هستند که ورود مواد شیمیایی کشاورزی[2] به محیط را کاهش می‌دهند یا پالایش زیستی را در جایگاه‌های آلوده به طور کارآمدتر انجام می‌دهند (ماسک و همکاران، ۲۰۰۸). گونه‌هایی که منجر به کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها شده‌اند یا گونه‌هایی که ژن‌هایی برای تجزیه ترکیب‌های آلی یا افزایش انباشت مواد معدنی دارند، نمونه‌هایی از این گیاهان مفید هستند.

هم اکنون بزرگ‌ترین نویدِ بهبود کارایی سامانه‌های پالایش ریشه/گیاه در روش‌هایی مانند ریزماهواره‌ها[3]، شناخت و دست‌کاری مجموعه میکروبی ساکن در رایزوسفر با استفاده از روش‌های جدید مانند DNA-SIP (پروب کردن با ایزوتوپ‌های پایدار)، به کارگیری روش‌های متاژنومیک (لی، ۲۰۰۶؛ لی و همکاران، ۲۰۰۷، آهلیک و همکاران، ۲۰۰۸) و بهبود همسانه‌سازی ریشه به ریزجانداران مفید (ویلاسایروس و همکاران، ۲۰۰۵؛ آگوئیره دکارسر و همکاران، ۲۰۰۷) است.

۱۴-۲- نقش رایزوسفر

ریشه‌پالایی[4] واژه‌ای جدا از گیاه‌پالایی نیست. ریشه‌های زنده‌ی گیاهان دگرگونی‌های شدید فیزیکی، شیمیایی و زیستی در خاک ایجاد می‌کنند. سطح مشترک ریشه-خاک، سطح ریشه[5]، و حجم باریک پیرامون ریشه‌ها رایزوسفر گفته می‌شود که چندین ویژگی مانند تراوش ترکیب‌های آلی،

1. Transgenic
2. Agrochemicals
3. Microarrays
4. Rhizoremediation
5. Rhizoplane

تنفس ریشه (جذب اکسیژن و رهاسازی دی‌اکسید کربن)، رهاسازی پروتون‌ها و دیگر یون‌ها و جذب آب و نمک‌ها را دارا است (مورل و همکاران، ۱۹۹۹).

گروه‌های گوناگون میکروبی (شامل باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و ویروس‌ها) در خاک وجود دارند. در رایزوسفر شمار آن‌ها بیشتر از خاک غیررایزوسفری است. تغییرات کیفی در جمعیت میکروبی دیده شده که تا به حال در بررسی ریزجانداران کشت‌شونده خود را نشان داده است. تا این‌که اخیراً تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر DNA اجازه تعیین تنوع میکروبی را به طور کامل می‌دهد (لی، ۲۰۰۶). ترکیب جمعیت میکروبی با فاکتورهای خاک و گیاه کنترل می‌شود که در بین آن‌ها ترکیب‌های با پیامدهای آللوپاتیک هم وجود دارند. فعالیت میکروبی شدید در رایزوسفر به دلیل حضور مقادیر بالای کربن در دسترس رها شده از تراوش‌های ریشه است. گیاهان با تغییر و اصلاح شرایط رشد یعنی ایجاد همزیستی و برهم‌کنش با موجودات زنده به حضور ریزجانداران پاسخ می‌دهند. برهم‌کنش رایزوبیوم-لگوم یا مایکوریز درونی و بیرونی تاثیر مثبت و مستقیمی دارند. استفاده از قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار (AM) در پالایش خاک توسط وُساتکا (۲۰۰۱) بحث شده است. همزیستی AM بر بسیاری از ویژگی‌های فیزیولوژی گیاهی، ریشه‌دهی، چرخه عناصر، دریافت عناصر و تولید گیاهی تاثیرگذار است (جانوسکوا و همکاران، ۲۰۰۵؛ سودوا و همکاران، ۲۰۰۷).

پیامدهای غیرمستقیم شامل تولید مواد افزاینده رشد (گلیک، ۲۰۰۶)، پادزیست‌ها[1] یا سیدروفورها است (رودولف و همکاران، ۱۹۸۵) که توسط گیاهان و باکتری‌ها آزاد می‌شوند. پیامدهای مثبت با مایه‌زنی ریشه‌ها توسط ریزجانداران گزینش شده (افزاینده‌های رشد، تثبیت کننده‌های نیتروژن، جذب کننده‌های فسفر و به ویژه آن‌هایی که ژن‌های تجزیه‌کنندگی دارند)، قابل پیش‌بینی هستند.

۱۴-۲-۱- تراوش‌ها و آنزیم‌های رها شده

تراوش‌های ریشه مهم‌ترین فرایند مرتبط با رایزوسفر هستند. افزون بر جذب و تجزیه زیستی مستقیم، گیاهان با رهاسازی تراوش‌های ریشه‌ای و آنزیم‌ها که فعالیت‌های میکروبی و بیوشیمیایی را در خاک پیرامونی زیاد می‌کند، از پالایش زیستی حمایت می‌کنند. ترکیب شیمیایی این تراوش‌ها، مکان ترشح و فاکتورهای گوناگون موثر برآن‌ها توسط مورل و همکاران (۱۹۹۹) بررسی شده است که شامل تنش تغذیه‌ای، حضور فلزها در اندازه مازاد و برخی از ریزجانداران است. تراوش‌ها ترکیب‌هایی با وزن مولکولی کم همانند مواد فنولیک، قندها یا اسیدهای آمینه و دیگر ترکیب‌ها، ترشحات، یاخته‌های لیزشده[2] و هم‌چنین ترکیب‌هایی با وزن مولکولی بالا یعنی

1. Antibiotics
2. Lysates

موسیلاژها[1] هستند. همه این ترکیب‌ها نقش مهمی در تشکیل مجموعه میکروبی ساکن در رایزوسفر دارند.

۱۴-۲-۲- روش‌های استفاده شده در گیاه‌پالایی

این روش‌ها شامل طیف گسترده‌ای مانند استخراج توسط گیاهان، تجزیه مستقیم توسط گیاهان، فیلتراسیون ریشه‌ای و ایجاد سامانه‌های آبگیر مصنوعی، همکاری دوسویه با ریزجانداران در فرایند پالایش ریشه‌ای یا توسعه و معرفی گیاهانِ متناسب با نیازهای ویژه‌ی گیاه‌پالایی و استفاده از مهندسی ژنتیک هستند که به طور خلاصه در ادامه می‌آیند (کانینگهام و همکاران، ۱۹۹۵؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۰؛ مک کوچئون و اشنور، ۲۰۰۳):

پایدارسازی توسط گیاهان[2]، برای کاهش پویایی و فراهمی آلاینده‌ها صورت گرفته و به پایدار کردن خاک آلوده با پوشاندن سطح آن با گیاهان سازگار کمک می‌کند و خطر انتقال آلاینده‌های جذب شده در فاز جامد ریز را کاهش می‌دهد.

انباشت توسط گیاهان، بر اساس توان گیاهان به جذب ترکیب‌ها از خاک، انتقال و متراکم کردن برخی از مواد در بخش‌های (ترجیحاً) قابل برداشت است.

فیلتراسیون ریشه‌ای، کاوش خاک توسط ریشه‌های گیاه برای جذب و برداشتِ آلاینده‌ها به ویژه فلزها از محلول پیرامون ریشه است.

تجزیه مستقیم توسط گیاه (دگرگونی توسط گیاه[3])، تبدیل یا تجزیه آلاینده‌های آلی توسط گیاهان از راه فرایندهای متابولیک درونی گیاه یا تجزیه آلاینده‌ها در بیرون گیاه توسط آنزیم‌های رها شده توسط گیاهان است.

تبخیر توسط گیاهان، جذب و انتقال برخی آلاینده‌ها به فاز گازی توسط گیاهان است و شامل نشر[4] آلاینده توسط گیاه و رها کردن خود آلاینده یا گونه تغییریافته آن از گیاه به اتمسفر است.

استفاده از گیاهان برای حذف آلاینده‌ها از هوا نشان‌دهنده‌ی توان گیاهان برای انباشت و متابولیز کردن ترکیب‌های سمی از هوا است (بورکن و ژیانگمائو، ۲۰۰۶).

---

1. Mucilages
2. Phytostabilisation
3. Phytotransformation
4. Transpiration

۱۴-۲-۲-۱- آب‌گیرهای مصنوعی

استفاده از آب‌گیرهای مصنوعی برای پالایش آب‌های آلوده انجام شده و مقرون به صرفه است. در مبحث گیاه‌پالایی باید به این سامانه‌ها اشاره شود چون گیاه جزء جدایی‌ناپذیر آب‌گیرهای مهندسی شده است که اغلب از نی معمولی[1]، جگن[2] و علف معطر[3] تشکیل می‌شود. بیشتر آب‌گیرها به ترکیبی از سوبسترای نسبتاً کاهنده و شرایط اکسیدی پیرامون ریشه متکی هستند (آته و جیکوب، ۲۰۰۶؛ ویسنر و همکاران، ۲۰۰۶؛ ژاک و همکاران، ۲۰۰۶).

۱۴-۲-۲-۲- دورنمایی از سمیت‌زدایی توسط گیاهان در CWD[4]

از گیاهان می‌شود برای از بین بردن جنگ‌افزارهای شیمیایی، سمیت‌زدایی از برخی ترکیب‌های شیمیایی جنگی و همچنین برای سمیت‌زدایی از برخی ترکیب‌ها که در تجزیه و خنثی‌سازی جنگ‌افزارهای شیمیایی در عملیات نظامی به وجود می‌آیند، استفاده کرد. معمولاً از گیاهان انتظار می‌رود که در گام پایانی و برای پردازش نهایی مکانی که به روش‌های دیگر از آن آلودگی‌زدایی شده استفاده کرد، اما نشان داده شده که گیاهان و آنزیم‌هایشان می‌توانند نقش فعالی در تجزیه تعداد زیادی از ترکیب‌های سمی که مستقیماً به عنوان بخشی از فن‌آوری راه‌اندازی هستند، داشته باشند (ماسک و همکاران، ۱۹۹۸، ۱۹۹۹).

۱۴-۳- جنبه‌های پژوهشی

۱۴-۳-۱- کشت درون شیشه‌ی[5] گیاه در پژوهش‌های گیاه‌پالایی

افزون بر گیاهانی که در خاک و آب رشد می‌کنند، برای دانستن درباره‌ی برخی فرایندهای گیاه‌پالایی، کشت‌های سوسپانسیون یاخته‌ای و کالوس همگن تمایز نیافته، کشت‌های جنینی تمایزیافته، کشت تومور ساقه و ریشه مویین که به صورت استریل در شیشه کشت می‌شوند، نیز مفید بوده‌اند (ماسک وهمکاران، ۲۰۰۴). همه سامانه‌های اشاره شده در شرایط آزمایشگاهی قابل رشد هستند و رشد آن‌ها مستقل از آب و هوا و اقلیم است، تندتر از گیاه در شرایط عادی رشد می‌کنند و نتایج با هزینه آزمایشی کمتری قابل استحصال است و امکان جدا کردن پیامدهای گیاهان از ریزجانداران در آن‌ها وجود دارد.

---

1. Common reed
2. Cattail
3. Sweetgrass
4. Chemical weapon demilitarisation
5. *In vitro*

۱۴-۳-۱-۱- کشت‌های سوسپانسیون یاخته‌ای و کالوس

از سال‌ها پیش در پژوهش‌های مقاومت به علف‌کش‌ها و متابولیسم (هارمز و کوتوتز، ۱۹۹۰) یا متابولیسم آفت‌کش‌ها (ویمر و همکاران، ۱۹۸۷) از یاخته‌های گیاهی کشت داده شده در شیشه استفاده می‌شود. نتایج کشت‌های درون شیشه‌ای به ویژه در کشت‌های تمایزنیافته بایستی به دقت ارزیابی شود چرا که تغییرات در بین کالوس‌ها حتی در یک گونه گیاهی بالا است (ماکوآ و همکاران، ۱۹۹۷a). با آزمایش ۱۲ کشت درون شیشه‌ای یک گونه از گیاه سیب کانگورو یا شب تاب[1] (ماسم، ۱۹۸۹) برخی سویه‌ها اصلاً نتوانستند PCB ها را تبدیل کنند در حالی‌که برخی سویه‌ها شدت تبدیل بالایی در شرایط یکسان داشتند. فعالیت تجزیه‌ای بیشتر به اندازه‌ی تمایز بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی سویه یا کلون مورد آزمایش بستگی دارد. غیر از کلون‌های منفی که شاید بعضی از آنزیم‌ها را نداشتند، آن‌هایی که توانستند سمیت‌زدایی و تجزیه را انجام دهند، ابزار بسیار مهمی در سرنوشت زیست‌بیگانه‌ها در یاخته‌های گیاهی دارند.

۱۴-۳-۱-۲- کشت‌های ریشه مویین

کشت‌های ریشه مویین با انتقال ژنتیکی یک یاخته گیاهی با باکتری خاک‌زی *اگروباکتریوم رایزوژنز*[2] انجام می‌شوند. به دلیل رشد تند، تکثیر نامحدود در محیط کشت، پایداری ژنتیکی و بیوشیمیایی و رشد در محیط‌های بدون هورمون، ثابت شده است که این بافت یک مدل بسیار خوب است. بهره‌برداری از مدل‌های ریشه مویین در بررسی‌های شنکس و مورگان (۱۹۹۹) و پلچ و همکاران (۱۹۸۹) خلاصه شده است. محدودیت کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های مویین در مقایسه با ریشه‌های طبیعی ناشی از ویژگی‌های تغییریافته است که در آن تولید کامل کوتیکول، واکس‌ها و سایر ترکیب‌ها بر جذب سطحی و به درون کشیدن مواد زیست‌بیگانه تاثیر می‌گذارند. در یک گزارش فوق‌العاده از دوران (۱۹۹۷) همه جنبه‌های مطالعه و کاربرد ریشه‌های مویین گردآوری شده است. درچند سال گذشته بررسی‌های بیشتری انجام شده اما جنبه‌های کاربردی گیاه‌پالایی در برخی از آن‌ها مورد بحث و بررسی واقع شده است (پلچ و همکاران، ۱۹۹۹، گلبا و همکاران، ۱۹۹۹). بیش از یک دهه است که از کشت‌های ریشه مویین در گیاه‌پالایی استفاده می‌شود. اولین مورد آن برای جذب کادمیوم (ماسک و همکاران، ۱۹۹۴، ۱۹۹۷) و تجزیه PCB (ماکوا و همکاران، ۱۹۹۷b) بود. سودک و همکاران (۱۹۹۸) جذب فلزهای گوناگون توسط ریشه‌های مویین ترب کوهی[3] را

---

1. *Solanum aviculare*
2. *Rhizogenes*
3. Horseradish

مقایسه کردند. با استفاده از کشت ریشه‌های مویین سنبل[1] نشان داده شد که بیش‌اندوزی ضرورتاً به بودن ساقه‌ها یا انتقال ریشه-ساقه بستگی ندارد (ندلکوسکا و دوران، ۲۰۰۲).

۱۴-۴- روش‌های مهندسی ژنتیک

ظرفیت مهندسی ژنتیک برای افزایش تجزیه زیستی مواد زیست‌بیگانه از دهه ۸۰ میلادی شناسایی شده و تلاش‌های اولیه روی ریزجانداران متمرکز بوده است. البته بیشتر مشکلات مرتبط با معرفی موجودات تغییر یافته ژنتیکی[2] (GMO) شامل موانع قانونی رهاسازی آن‌ها در محیط و زمان زنده‌مانی کم آن‌ها پس از ورود به خاک آلوده واقعی بوده است. مشکل بعدی بازتابِ نبود دانش کافی درباره‌ی مجموعه میکروبی موجود در خاک واقعی و روش‌های برهم‌کنش آن‌ها است. زنده‌مانی گونه باکتریایی وارد شده به خاک را می‌توان با معرفی سویه‌ای که مزیت ترجیحی دارد مانند همسانه‌کنندگان ریشه که توسط گیاه حمایت می‌شوند، بهبود بخشید (ویلاسایروس و همکاران، ۲۰۰۵).

با استفاده از گیاهان به جای ریزجانداران به عنوان سامانه‌های زیستی مهندسی شده ژنتیکی برای پاک‌سازی محیط هم می‌توان به موانع قانونی در این زمینه فائق آمد. در راستای پالایش، گیاهان افزون بر توانایی در جذب، انباشت یا متابولیزه کردن مواد زیست‌بیگانه، توان حمایت گزینشی از متابولیسم و زنده‌مانی باکتری‌های تجزیه‌کننده در رایزوسفر را هم دارند (لی و همکاران، ۲۰۰۶، ۲۰۰۷).

با قرار دادن مستقیم ژن جدید می‌توان توان متابولیسمی گیاهان را تقویت کرد. از روش مهندسی ژنتیک برای بهبود گیاهان کشاورزی گوناگون بهره‌گیری شده است. پیش‌بینی می‌شود که بشود از روش مشابهی برای افزایش توان گیاهان در زمینه سمیت‌زدایی زیست محیطی استفاده کرد (ماسک و همکاران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۸).

تولید گیاهان تراریخت برای حفاظت از محیط زیست دربردارنده‌ی دو زمینه کاملاً جدا از هم شامل جلوگیری از ایجاد آلودگی و حذف آلودگی است که البته اکنون برای هردو زمینه گیاهانی وجود دارند. گیاهان مهندسی شده‌ی جلوگیری‌کننده از آلودگی می‌توانند به طور چشم‌گیری از مواد شیمیایی موردنیاز برای رشد در کشاورزی بکاهند و از این راه آلودگی محیط را کم کنند. به تازگی یک روش جدید در مدیریت آفات ارائه شده که مبتنی بر ساخت گیاهانی است که فرمون‌های[3] حشره‌ها را تولید و منتشر می‌کنند (نسنروا و همکاران، ۲۰۰۴؛ ماسک و همکاران،

1. *Alyssum*
2. Genetically modified organisms
3. Pheromones

۲۰۰۸). گیاهان مهندسی شده‌ی حذف‌کننده آلودگی که قادر به تیمار آلودگی‌های مواد منفجره، حلال‌های کُلُری، جیوه، سلنیوم، فنولیک‌ها و غیره باشند، معرفی شده‌اند (مئاگر، ۲۰۰۰؛ مک‌کوچئون و اشنور، ۲۰۰۳؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۶؛ ماکوا و همکاران، ۲۰۰۶؛ ایپن و همکاران، ۲۰۰۷). این گیاهان هم دارای ژن‌های انتقالی مسئول متابولیسم ترکیب‌های آلی هستند (که از این راه مواد با سمیت کمتر و تجزیه شونده‌گی ساده‌تر را در خود انباشت می‌کنند) و هم دارای ژن‌هایی هستند که سبب افزایش انباشت ترکیب‌های معدنی در آن‌ها می‌شوند. این روش‌ها در بهینه‌سازی، بایستی سبب انباشت آلاینده‌ها در بخش‌های قابل برداشت شوند (ماسک و همکاران، ۱۹۹۶) و بنابراین حذف کلی آلودگی و جلوگیری از برگشت آن را سبب خواهند شد .

برهم‌کنش‌های پیچیده‌ی فعالیت‌های انتقال و کلاته شدن، شدت جذب و ذخیره فلز را کنترل می‌کنند. کلمنتس و همکاران (۲۰۰۲) در یک گزارش بسیار عالی، عوامل موثر بر انباشت، پویایی، جذب، ترسیب و انتقال در ساقه‌ی فلزها را بررسی کرده و نقش پروتئین‌های حامل از گروه‌های مختلف را مورد بحث قرار داده‌اند.

۱۴-۴-۱- جلوگیری از آلودگی

اولین نسل گیاهان تجاری تراریخت موجود (یعنی گیاهانی که سم Bt در آن‌ها بیان می‌شد) قادر به کاهش زیان وارد شده به محصول توسط حشره‌ها بودند و از این راه کاربرد آفت‌کش مورد نیاز را کم می‌کردند. نمونه دیگر سویا بود که در آن کاربرد آفت‌کش دوست‌دار محیط زیست امکان‌پذیر بود. هردوی این موارد و گیاهان مقاوم به علف‌کش موضوع بررسی‌های زیادی بوده‌اند (مونتاگو، ۲۰۰۵؛ واین، ۲۰۰۶). اما گیاهانی که فرمون حشره نشر می‌دهند جدید هستند (نسنروا و همکاران، ۲۰۰۴). با کاشت این گیاهان در نزدیک یا پیرامون کشتزارهای کشاورزی که نیاز به حمایت دارند و سپس با ترشح فرمون حشره توسط این گیاهان، حشره نر را جذب کرده و توان آن را برای جفت‌گیری کاهش می‌دهند. در این مورد لازم نیست که خود گیاه کشاورزی مهندسی شده باشد. با کاربرد این روش نه گیاه مهندسی شده و نه فرآورده آن وارد زنجیره غذایی انسان نمی‌شوند و بنابراین خطر سلامتی مرتبط با مصرف گیاهان مهندسی ژنتیک شده به وجود نمی‌آید. افزون بر این در این روش زندگی حشره غیرهدف تحت تاثیر قرارنمی‌گیرد و سویه حشره مقاوم هم ایجاد نمی‌شود. در حالی‌که استفاده از آفت‌کش‌ها هم به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (ماسک و همکاران، ۲۰۰۸).

۱۴-۴-۲- جانداران مهندسی ژنتیک شده برای گیاه‌پالایی

تلاش‌های زیادی برای اصلاح ژنتیکی بید، صنوبر و سایر گیاهان که در گیاه‌پالایی مفید هستند، انجام شده است. هدف از این کار، ایجاد گیاهانی است که توان بالا در انباشت، سمیت‌زدایی یا تجزیه مواد زیست‌بیگانه و آلاینده داشته باشند و در برابر ترکیب‌های سمی موجود مقاوم بوده و ویژگی‌های زراعی مناسب داشته باشند (ماسک و همکاران، ۲۰۰۲). اهمیت بهبود جذب فلزها با اصلاح یا تغییر ژنتیکی را می‌توان با این واقعیت نشان داد که پژوهش‌های مهم و جالب در زمینه بررسی گیاهان مهندسی ژنتیک شده مناسب برای انباشت فلز به صورت هم‌زمان انجام گرفته است (کلمنتس و همکاران، ۲۰۰۲؛ پیلون-اسمیتس و پیلون، ۲۰۰۲؛ لاسات، ۲۰۰۰).

بنابراین با پژوهش درباره‌ی گیاهان مهندسی ژنتیک شده نه تنها دانش بهتری از امکان تغییر و بهبود فرایندهای گیاهان نرمال به دست می‌آید، بلکه روش‌های افزایش بازدهی فرایند پالایش هم توسعه می‌یابد. فراهمی زیستی فلزها با تغییر تراوش‌های گیاهی، افزایش ترشح اسیدهای آلی یا همکاری با ریزجانداران رایزوسفری موجود افزایش می‌یابد که همین موارد در کنار افزایش عملکرد گیاهان تراریخت دورنمایی برای اهداف مهندسی ژنتیک هستند. بررسی اولیه گونه‌های گیاهی مختلف برای تولید سیدروفورهای گیاهی (رودولف و همکاران، ۱۹۸۵) بر اساس نیکوتیان‌آمین نشان داد که همه گیاهان عالی این قابلیت را دارند. تولید این ترکیب‌ها در گیاهان باید افزایش یابد یا اینکه این ترکیب‌ها را می‌توان با باکتری‌های مناسب تولید کرد.

۱۴-۴-۲-۱- روش‌های تهیه گیاهان تراریخت

مهم‌ترین وکتور[1] برای انتقال در ژنتیک گیاهی پلاسمیدهای گوناگون به دست آمده از *اگروباکتریوم* مانند Ti و Ri است که پیش‌تر با روش‌های مارتون و همکاران (۱۹۷۹) توصیف شده و امروزه تغییرات زیادی کرده است. روش‌های دیگر استفاده شده روش‌های بالیستیک[2] هستند که انتقال ژن به یاخته‌ها و به گیاه سالم را امکان‌پذیر می‌کنند. این روش‌ها مبتنی براستفاده از ذرات شتاب‌دار شده‌ی فلزهای سنگین (طلا یا تنگستن) پوشیده شده با مواد ژنتیکی است.

1. Vector
2. Ballistic

۱۴-۴-۳- نمونه‌هایی از گیاهان مهندسی ژنتیک شده برای گیاه‌پالایی

۱۴-۴-۳-۱- افزاش انباشت فلزهای سنگین

گیاهان از فرایند متابولیک طبیعی خود برای جذب فلزهای کمیاب استفاده می‌کنند. کاتیون‌ها یا اُکسی‌آنیون‌ها بایستی در بخش‌های قابل برداشت جمع شوند یا به اشکال با سمیت کمتر دگرگون شوند. اگرچه بیش‌اندوزهایی مانند *تلاسپ کائرولسنس*[1] می‌توانند سطوح مناسبی از فلزها را انباشته کرده و بازیابی آن‌ها را به صرفه کنند، اما چون زیست توده کمی دارند (مئاگر، ۲۰۰۰؛ ندلکوسکا و دوران، ۲۰۰۲)، مقدار آلاینده‌ای که می‌توانند از خاک برداشت کنند، کم می‌شود. زیرا مقدار برداشت تابعی از غلظت آلاینده در بافت گیاهی ضرب در مقدار زیست توده تولید شده است.

برای افزایش جذب فلزها، گیاهان تراریخت دارای مقدار زیادی آنزیم‌های گلوتاتیون سینتاز[2] یا فایتوکلاتین سینتاز[3] آماده شد که هردو سبب افزایش انباشت کادمیوم شدند (کارنلامپی و همکاران، ۲۰۰۰). گیاهان تراریخت دارای ژن‌های خارجی برای پروتئین‌های غشایی حامل فلزها هستند که در کرامر و کاردوننس (۲۰۰۱) آمده است. در برخی آزمایشگاه‌ها ژن‌های کد کننده‌ی انواع مختلف متالوتیونین[4] (که در پستانداران، مخمر، حشرات و انسان وجود دارد) به گیاهان وارد شد که سبب افزایش مقاومت گیاهان به فلزها شد (کارنلامپی و همکاران، ۲۰۰۰؛ ماسک و همکاران، ۱۹۹۶) اما انباشت آن‌ها را افزایش نداد.

روش امیدبخش دیگر برای افزایش جذب فلزها استفاده از ژن نیکوتیان آمین سینتاز است که در تشکیل فایتوسیدروفورها نقش دارد. فایتوسیدروفورها آمینواسیدهای متصل شونده به فلزها هستند (رودولف و همکاران، ۱۹۸۵) که زیست فراهمی فلزها برای گیاهان را افزایش می‌دهند. نمونه‌های جالب گیاهان حامل ژن مرکوریک ریداکتاز[5] باکتریایی که یون‌های جیوه را به فلز گازی بخارشونده کاهش می‌دهند و مرB- ارگانومرکوریال لیاز باکتریایی[6] هستند. این ژن‌ها که جداگانه یا با هم به آرابیدوپسیس[7] و تنباکو همسانه‌سازی شده‌اند (هیتون و همکاران، ۱۹۹۸؛ راف و همکاران، ۱۹۹۶) منجر به تولید گیاهان تراریخت مقاوم به جیوه شده که جیوه را به حالت گازی درآورده و به اتمسفر می‌فرستند. برای آزمایش کارایی این گیاهان تراریخت در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به جیوه، صنوبر زرد به دلیل ویژگی‌های زیستی و ساختاری مناسب انتخاب شد (راف و همکاران،

---

1. *Thlasp caerulescens*
2. Glutathione synthase
3. Phytochelatin synthase
4. Metallothionein
5. Mercuric reductase
6. MerB — bacterial organomercurial lyase
7. Arabidopsis

۱۹۹۸). گیاهان دیگری هم آماده‌سازی شدند که قادر به انباشت جیوه به جای رهاسازی آن به اتمسفر بودند (بیزیلی و همکاران، ۲۰۰۰).

در هر صورت راه‌کار معمول، پروتئین‌های درگیر در هومئوستازی[1] فلزها (متالوتیونین‌ها، فایتوکلاتین‌ها و گلوتاتیون) را برای دست‌کاری ژنی، هدف قرار می‌دهد (کوتربا و همکاران، ۱۹۹۹؛ کلمنتس و همکاران، ۲۰۰۲). اگرچه این روش‌ها به طور معمول دست‌کاری آنزیم‌های گیاهی مسئول در تشکیل فایتوکلاتین‌ها و ترکیب‌های وابسته مانند بیان بیش از اندازه گلوتاتیون سینتتاز، گاما-گلوتامیل سیستئین سینتتاز[2] و فایتوکلاتین سینتاز را شامل می‌شود، ولی دست‌کاری سایر آنزیم‌ها هم موفق بوده است. بیان ژن متالوتیونین در گیاهان را هم پیش‌تر ملاحظه کرده‌اید (پن و همکاران، ۱۹۹۴؛ هاسگاوا و همکاران، ۱۹۹۷). اما کارهای ما بیشتر بر افزایش توان گیاه به انباشت فلزها با وارد کردن پروتئین‌های اتصالی بیشتر به گیاه بوده که میل ترکیبی بالا به فلز داشته باشد (ماسک و همکاران، ۲۰۰۲). این گونه الحاق پروتئین‌ها با حامل هیستیدین (ماسک و همکاران، ۱۹۹۶؛ پاولیکوا و همکاران، ۲۰۰۴a) در خاک آلوده واقعی آزمایش شده است و فاکتورهای انتقالی برای کادمیوم، روی و نیکل برآورد شده‌اند (پاولیکوا و همکاران، ۲۰۰۴b؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۵). در آزمایش ما تنباکوی تراریخت در مقایسه با شاهد ۱۹ درصد کادمیوم را در زیست توده روزمینی خود انباشته کرد.

یک راه برای تقویت این روش کلون کردن توالی‌های کوتاه متصل شونده به فلزها (سرشار از سیستئین) به گیاه برای افزایش ویژگی‌های جذب فلزها بوده که آزمایش شده است (کوتربا و همکاران، ۱۹۹۹). این روش با پژوهش‌های دقیق شیمیایی برهم‌کنشِ یون‌های فلزی با گروه‌های عاملی مرتبط زیستی پیگیری شد. این پژوهش‌ها نشان دادند که امکان اتصال بیشتر پروتئین‌های الحاقی وجود دارد. در ادامه از شیمی ترکیبی نظری برای کمپلکس شدن و گزینش‌پذیری یون‌های فلزی در جایگاه‌های مدل استفاده شد (رولیسک و هاوالاس، ۲۰۰۰، ۲۰۰۳) که سبب طراحی جایگاه‌هایی با قابلیت انتخابی بیشتر شده که ممکن است در زنجیره پلی‌پپتید ادغام شده باشند.

۱۴-۴-۳-۲- گیاهانی با توانایی تقویت شده برای سمیت‌زدایی ترکیب‌های آلی پایدار

برای غلبه بر مواد زیست‌بیگانه آلی گیاهان از فرایندی که برای مبارزه با مواد شیمیایی آللوپاتیک دارند، استفاده می‌کنند. مواد آللوپاتیک ترکیب‌های سمی هستند که توسط گونه‌های رقیب و برای رقابت بر سر منابع تولید می‌شوند (ساندرمن، ۱۹۹۴؛ مئاگر، ۲۰۰۰؛ بایس و همکاران، ۲۰۰۴). حذف ترکیب‌های آلی توسط گیاهان به طور گسترده در مقاله‌ها (ایپن و همکاران، ۲۰۰۷؛ ماسک و

1. Homeostasis
2. Gamma-glutamylcysteine synthetase

همکاران، ۲۰۰۰؛ راسکین و همکاران، ۱۹۹۶) و کتاب‌ها (مک‌کوچئون و اشنور، ۲۰۰۳؛ ماکوا و همکاران، ۲۰۰۶) بحث شده است.

برای افزایش توان طبیعی گیاهان، سیتوکروم‌های P450 گوناگون را به گیاهان وارد کرده‌اند. این آنزیم‌ها مسئول فاز اول سمیت‌زدایی و واکنش فعال‌سازی ترکیب‌های با تجزیه‌شوندگی سخت در گیاهان هستند. پژوهش دوتی و همکاران (۲۰۰۷) معرفیِ صنوبر تراریخت که در آن سیتوکروم P450 پستانداران بیشتر بیان می‌شد را توصیف کرده است. گیاهان مهندسی شده عملکردِ حذف و متابولیسم بالایی برای انواعی از آلاینده‌های آلی سمی بخارشونده، شامل تری‌کلرواتیلن، وینیل کلراید، تتراکلرید کربن، کلروفرم و بنزن داشتند. نکته جالب این بود که بیان پراکسیدازهای اصلی در گوجه‌فرنگی (ویوار اُلر و همکاران، ۲۰۰۵) سبب افزایش گیاه‌پالایی فنول شد و این فرضیه را تقویت کرد که جدا از سیتوکروم‌های P450، پراکسیدازها هم در فاز اول تجزیه درگیر هستند (کروما و همکاران، ۲۰۰۳).

تجزیه زیستی مواد منفجره توسط گیاهان تراریخت که ژن پنتا اریتریتول تترانیترات ریداکتاز[1] در آن‌ها بیان شده است، نمونه قدیمی از استفاده از ژن‌های باکتریایی در گیاه‌پالایی است (فرنچ و همکاران، ۱۹۹۹). بعدها گیاهانی ساخته شدند که در آن‌ها آنزیم‌های باکتریایی بیان می‌شوند که قادر به تغییرشکل TNT و تجزیه RDX [2] (یک نیتروآمین انفجاری که به طور گسترده‌ای در برنامه‌های نظامی و صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد) هستند (بروس، ۲۰۰۷). برای رسیدن به تجزیه هوازی PCBهای پایدار که در همه جا هستند، ابتدا باید آن‌ها را با هیدروکسیلاسیون فعال کرد. مشکلی که یاخته‌های گیاهی در تجزیه موثر PCBها دارند، بازکردن حلقه بی‌فنیل است که با آنزیم *bphC* باکتریایی شدنی است. این آنزیم مسئول برش مشتقات PCB هیدروکسیله شده، حتی آن‌هایی که توسط گیاهان تولید می‌شوند، است (فرانکوآ و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین همکاری باکتری‌ها و گیاهان در تجزیه PCB به طور کامل مطالعه شده است (ویلاسایروس و همکاران، ۲۰۰۵؛ لی و همکاران، ۲۰۰۶؛ لی و همکاران، ۲۰۰۷؛ ماکوا و همکاران، ۲۰۰۷؛ آگوئیره دکارسر و همکاران، ۲۰۰۷). تولید گیاه تنباکو که دارای ژن *bphC* باکتریایی بوده و توان رشد در غلظت بالای PCB داشته باشد، توسط ماسک و همکاران (۲۰۰۵) انجام شده است. با بیان ژن‌های باکتریایی بی‌فنیل کلروفنیل دی‌اکسیژناز در تنباکو توسط محمدی و همکاران (۲۰۰۷) و نواکوا و همکاران (۲۰۰۹) اختصاصی بودن سوبسترا هم بهبود یافت.

---

1. Pentaerythritol tetranitrate reductase
2. Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5 triazine

۱۴-۵- سایر روش‌ها برای افزایش کارایی فرایند گیاه‌پالایی

۱۴-۵-۱- متابولیت‌های ثانویه گیاهان و نقش آن‌ها در گیاه‌پالایی

اهمیت این ترکیب‌ها مورد بحث واقع شده است (سینگر و همکاران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۳؛ سینگر، ۲۰۰۶). درباره متابولیسم ترکیب‌های زیست‌بیگانه آلی در گیاهان، کل فرایند بر مبنای ساز و کاری است که گیاه برای روبه رو شدن با ترکیب‌های آللوپاتیک طبیعی اتخاذ کرده است. بیشتر فرآورده‌های گیاهی از راه تراوش و برگشت بقایای ریشه، به ناحیه ریشه می‌ریزند. برخی از این ترکیب‌ها برای میکروب‌ها انرژی فراهم می‌کنند، برخی منبع کربن می‌شوند و برخی هم حتی سبب تحریک مسیرهای تجزیه می‌شوند. مقدار تراوش ریشه و ترکیب‌های رها شده از ریشه‌های درحال مرگ و پوسیده شده (فلچر و همکاران، ۱۹۹۵) نشان می‌دهد که دامنه گسترده‌ای از مولکول‌ها می‌توانند به طور مستقیم در جذب فلزها و تحریک باکتری‌ها نقش داشته باشند. بیوسنتز این‌ترکیب‌ها هم می‌تواند هدف مناسبی برای دست‌کاری‌های ژنتیکی باشد که توسط گلبا و همکاران (۱۹۹۹) بحث شده است.

ریشه‌های گیاه درحال رشد ذرات خاک اطراف را جست‌وجو کرده و آب، عناصرغذایی، عناصر کمیاب و سایر ترکیب‌ها را جذب می‌کنند و بنابراین نقش مهمی در پالایش زیستی دارند. ریشه‌های گیاهان می‌توانند آلاینده‌ها را از خاک استخراج کرده، انباشت نموده، تغییر داده و به سایر قسمت‌های روزمینی گیاه منتقل کنند. در برگ‌ها، میوه‌ها و ساقه بیشتر ترکیب‌ها ذخیره شده، تغییر یافته یا تبخیر می‌شوند. به این فرایندها گیاه‌پالایی گفته می‌شود. ریشه‌های درحال رشد همچنین به پراکنده شدن ریزجانداران در خاک کمک کرده و از این راه از پالایش ریشه‌ای حمایت می‌کنند.

۱۴-۵-۲- تاثیر باکتری‌های همزیست

یک نمونه از این تاثیرات، نقش باکتری افزاینده رشد است که سمیت نیکل در گیاهچه‌ها را کم می‌کند. بورد و همکاران (۱۹۹۸) *کلویورا آسکورباتا*[1] را معرفی کردند که سیدروفور تولید کرده و فعالیت ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید دی‌آمیناز را نشان می‌دهد. حضور این باکتری، جذب نیکل توسط گیاهچه‌ها در خاک آلوده را کم نکرد. بنابراین، احتمالاً تقویت رشد گیاه از راه کاهش سطح هورمون تنش اتیلن گیاه رخ داده که حضور نیکل محرک تولید آن است (گلیک، ۲۰۰۶).

1. *Kluyvera ascorbata*

۱۴-۵-۲-۱- باکتری‌های همزیست تغییریافته‌ی ژنتیکی

باکتری‌های همزیست تغییریافته‌ی ژنتیکی همکاری متقابل بیشتری را بین گیاه و باکتری سبب می‌شوند. مطالعه موجودات دست‌کاری شده ژنتیکی اخیراً شامل دیگر روش‌ها برای دست‌کاری ژنتیکی ویژگی‌های سامانه‌های گیاه‌پالایی مانند ترغیب رشد برای تولید زیست توده بهتر هم شده است. به همین دلیل گلیک و همکارانش (ما و همکاران، ۲۰۰۲؛ گلیک، ۲۰۰۶) باکتری‌های افزاینده‌ی رشد گیاهی را دست‌کاری کرده و فاکتورهایی مانند تولید اسید ایندول استیک، پادزیست‌ها، فعالیت ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید دی‌آمیناز یا سیدروفورها را آزمایش کردند. تولید زیاد ژن‌های باکتریایی باکتری‌های مایه‌زنی شده به رایزوسفر کانولا[1] سبب افزایش چشم‌گیر طول ریشه و ساقه شد و بنابراین ظرفیت گیاه‌پالایی را افزایش داد. گریچکو و همکاران (۲۰۰۰) افزایش توان گیاهان تراریخت در بیان آنزیم‌های باکتریایی ACC دی‌آمیناز برای انباشت کادمیوم، کبالت، مس، نیکل، سرب و روی را گزارش کردند.

اصلاح ژنتیکی ریزجانداران برای بهبود عملکرد آن‌ها در رایزوسفر فرصت چالش برانگیزی است که نباید به سادگی از آن گذشت. زیرا در حال حاضر رهاسازی آن‌ها در محیط نیز محدود شده است. توان باکتری‌های تجزیه کننده در همسانه‌سازی ریشه را می‌توان با بهبود ریزجانداران همزیست دست‌کاری کرد. یکی از نمونه‌ها در این مورد، پالایش ریشه‌ای PCBها توسط *سودوموناس فلورسنس* است که در آن تجزیه بی‌فنیل با استفاده از سامانه‌ای که به سیگنال‌های ریشه یونجه پاسخ می‌دهد ، تنظیم می‌شود (ویلاسایروس وهمکاران، ۲۰۰۵). وارد کردن این چنین ریزجانداران دست‌کاری شده ژنتیکی تضمین می‌کند که هرگونه تغییر تنها به مجموعه باکتری‌های بومی ساکن در رایزوسفر محدود شده و به سایر جاهای خاک نمی‌رسد (آگوئیره دکارسر و همکاران، ۲۰۰۷).

به نظر می‌رسد توسعه باکتری‌های اندوفیت مهندسی شده که گیاه‌پالایی ترکیب‌های آلی فرار محلول در آب را افزایش می‌دهند، روش امیدبخش‌تری باشد (باراک و همکاران، ۲۰۰۴). اثبات شده که باکتری‌های تجزیه کننده تری‌کلرواتیلن (TCE) از گیاه میزبان در برابر سمیت TCE حمایت می‌کنند و در کاهش تبخیر و تعرق TCE نقش چشم‌گیری دارند.

---

1. Canola

۱۴-۵-۲-۲- همزیستی مایکوریزایی

قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار یکی دیگر از سامانه‌های بسیار مهم، برای تاثیر در رفتار گیاهان در خاک آلوده هستند. این‌گونه همزیستی نقش مهمی در جذب عناصر توسط گیاهان دارد. نقش آن در فرایند گیاه‌پالایی توسط دونلی و همکاران (۱۹۹۴)، فلچر و همکاران (۱۹۹۵) و وساتکا (۲۰۰۱) ارزیابی شده است.

۱۴-۵-۲-۳- متاژنومیک و روش‌های مولکولی

روش‌های ژنومی مبتنی بر روش‌های مولکولی مستقل از کشت هستند که دید جدیدی به درک ما از محیط زیست آلوده می‌دهند (لی، ۲۰۰۶). روش‌های شناسایی که به تازگی ارائه شده‌اند، شامل: RT-PCR و کاوش با ایزوتوپ پایدار هستند که منجر به درک عمیق‌تر از پیامد آلاینده‌ها و گیاهان بر ریزجانداران شده‌اند (لی و همکاران، ۲۰۰۶؛ ماسکوا و همکاران، ۲۰۰۷). متاژنومیک یا آنالیز مجموعه ژنوم جمع‌آوری شده از زیستگاه مورد مطالعه، حضور و فعالیت ریزجانداران تجزیه کننده در جامعه میکروبی رایزوسفر را نشان داده و ردیابی پاسخ به ترکیب‌های رها شده توسط گیاهان را امکان‌پذیر می‌کند (سینگر و همکاران، ۲۰۰۳). دانستن درباره‌ی نقش جمعیت میکروبی در جامعه پیچیده چالش مهمی در بوم‌شناسی میکروبی و پژوهش درباره‌ی زیست‌پالایی است (لیق و همکاران، ۲۰۰۷). روش‌های کشت میکروب‌ها تنوع آن‌ها در زیستگاه را کمتر برآورد می‌کنند. زیرا تنها یک درصد آن‌ها قابل کشت هستند. روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA، امکان تعیین کامل و جامع فعالیت میکروبی را فراهم می‌کند، اما ارتباط بین ماهیت و نقش ریزجانداران را نشان نمی‌دهد. اولین تکنیک مولکولی مستقیم برای ارتباط فیلوژنی با عملکرد روش کاوش DNA با ایزوتوپ‌های پایدار است (DNA-SIP). اساس این روش فراهم کردن سوبسترای نشان‌دار با ^{13}C برای جامعه میکروبی و سپس آنالیز ^{13}C-DNA جدا شده از جامعه است (آهلیک و همکاران، ۲۰۰۸).

۱۴-۶- نتیجه‌گیری

پژوهش‌گران به این نتیجه رسیدند که استفاده از درختان در مقایسه با گیاهان کوچک‌تر، امکان تیمار آلودگی‌های عمیق‌تر را فراهم می‌آورد. زیرا ریشه درختان از عمق بیشتری برخوردار است (کومیوِس و گولنر، ۲۰۰۶). به طور مشخص دو زیرمجموعه از گیاه‌پالایی نزدیک به تجاری شدن هستند. اولی استخراج توسط گیاهان است که در آن گیاهان انباشته کننده فلز که زیست‌توده بالا ایجاد می‌کنند و اصلاح کننده‌ی مناسب خاک هستند به کار می‌روند که فلز را از خاک به بخش‌های قابل برداشت ریشه و ساقه که روی زمین است، منتقل کرده و سپس با روش‌های کشاورزی رایج،

قابل برداشت هستند. دومی فیلتراسیون ریشه‌ای است که در آن ریشه‌های گیاهان رشد کرده در آب، فلزها و مواد آلی سمی پساب آلوده را جذب می کنند، تغلیظ می کنند و رسوب می‌دهند. در هردو مورد، پیش‌بینی می‌شود که هزینه پالایش آلاینده‌های آلی پایین و هزینه پالایش فلزهای سنگین بالا باشد (بویاجیان و کریرا، ۱۹۹۷). مهم‌ترین برتری گیاه‌پالایی در مقایسه با روش‌های پالایش قدیمی شامل موارد زیر است (سالت و همکاران، ۱۹۹۵؛ اشنور و همکاران، ۱۹۹۵):

- در محیط زیست به مراتب اختلال کمتری ایجاد می‌کند.
- نیاز بسیار کمی به جایگاه دفن خاک است.
- پذیرش عمومی خوبی دارد.
- نیاز به حفاری و عبور و مرور ماشین‌های سنگین نیست.
- ظرفیت چندجانبه بودن در تیمار گسترده‌ای از مواد خطرناک را دارد.

با در نظر گرفتن این فاکتورها و هزینه کم گیاه‌پالایی، به نظر می‌رسد در این روش اجرای پاک‌سازی در مقیاس بزرگ‌تری از دیگر روش‌ها امکان‌پذیر باشد. این فرایند نسبتاً ارزان است و از همان تجهیزاتی استفاده می‌کند که در کشاورزی به کار گرفته می‌شود.

گیاه‌پالایی چند مشکل فنی ذاتی دارد. آلاینده باید در ناحیه ریشه گیاه باشد یا به سمت آن برده شود. این امر محدودیت‌هایی درباره‌ی آب، عمق، عناصر غذایی، و محدودیت‌های فیزیکی، شیمیایی و اتمسفری به دنبال دارد. جایگاه بایستی به اندازه کافی بزرگ بوده تا مناسب روش‌های کشاورزی باشد. همچنین ممکن است تاخیر قابل‌توجهی در زمان موردنیاز برای رسیدن به نتایج پاک‌سازی مطلوب بین گیاه‌پالایی و حفاری باشد. افزون براین، ایجاد پوشش گیاهی ممکن است در جایی که سمیت شدید باشد، محدود شود. آلاینده‌ای که در برگ انباشته می‌شود، با ریزش لاش‌برگ[1] دوباره به محیط برمی‌گردد. انباشت آلاینده و متابولیت‌های آن در مسیر انرژی گیاه را می‌توان به عنوان یک مزیت در مورد سوزاندن مناسب و برداشت و حذف فلز از خروجی درنظر گرفت. در برخی موارد ممکن است حلالیت آلاینده افزایش یابد که سبب آسیب بیشتر زیست محیطی و مهاجرت آلاینده می‌شود.

افزایش دانش درباره فاکتورهایی که در گیاه‌پالایی مهم هستند، مبنایی برای اصلاح ژنتیکی گیاهان در راستای افزایش عملکرد فراهم خواهد کرد (راسکین، ۱۹۹۶؛ ماسک و همکاران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۸). این تغییرات، اصلاح گیاهان برای افزایش پروتئین‌ها یا پپتیدهای ویژه برای اتصال و انتقال مواد زیست‌بیگانه، افزایش کمیت و فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده گیاهان (فرانکوا و همکاران،

1. Leaf litter

۲۰۰۳) شـــامل آن‌هایی که به رایزوســـفر و خاک پیرامونی می‌روند تا عملکرد باکتری‌ها را افزایش دهند، را در برخواهند گرفت.

روش‌های دیگر که بحث شـــده‌اند ممکن اســـت کارایی فرایند را بالا ببرند و احتمالاً اســـتفاده مشترک از روش‌های بیشتر به صورت هم‌زمان، سبب بهره‌برداری بیشتر از ظرفیت واقعی گیاه شود. تنها کاهش در مقدار آلودگی زیسـت محیطی می‌تواند از ورود ترکیب‌های سمی به زنجیره‌ی غذایی جلوگیری کند و سـلامتی انسـان و تنوع زیسـتی را حفظ کند (که مطمئناً بیشـتر از سوی آلودگی محیط زیست در خطر است تا گیاهان تغییر یافته ژنتیکی) (ماسک و همکاران، ۲۰۰۰، ۲۰۰۸) و از این طریق در توسعه پایدار نقش داشته باشد.

پیش‌بینی می‌شـود که در آینده‌ی نزدیک گیاهان دسـت‌کاری شده ژنتیکی استفاده گسترده‌ای داشـته باشـند و نه تنها کاربرد آفت‌کش‌ها در کشاورزی را تا اندازه‌ی چشم‌گیری کاهش دهند، بلکه بقایای مواد شـیمیایی کشـاورزی و آلاینده‌های صـنعتی و تصادفی در محیط را به طور فعالی حذف کنند. در پاک‌ســازی محیط در مقیاس وســیع‌تر، آینده به ســوی گیاهان ویژه‌ی گیاه‌پالایی گرایش دارد که قادر باشـند فعالیت‌های میکروبی را در رایزوسـفر حمایت کنند. به هر حال برای استفاده از این امکانات در مقیاس وسـیع، ابتدا لازم اسـت که تغییراتی در قوانین موجود صـورت گیرند، موانع قانونی رفع شـــوند و دیدگاه عمومی درباره نگرش به گیاهان دســـت‌کاری شـــده ژنتیکی بهبود یابد (ماســـک و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعات ژنومی در آینده‌ی نزدیک بایســـتی ســـبب طراحی شـــرایط، گیاهان و ریزجاندارانی شود که از مجموعه مناسب موجودات با کارایی بالا حمایت کنند.

منابع

Aguirre de Carcer D, Martin M, Mackova M, Macek T, Karlson U, Rivilla R (2007) The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. ISME J 1:215–223.

Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. Trends Plant Sci 9:26–32.

Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD (1994) The possibility of in situ heavy-metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. Resour Conservat Recycl 11:41–49.

Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. Nat Biotechnol 22:583–588.

Bizily S, Rugh C, Meagher R (2000) Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nat Biotechnol 18:213–217.

Bock C, Kolb M, Bokern M, Harms H, Mackova M, Chroma L, Macek T, Hughes J, Just C, Schnoor J (2002) Advances in phytoremediation: phytotransformation. In: Reible D.

Demnerova K (eds) Innovative approaches to the on-site assessment and remediation of contaminated soils. Kluwer, Dordrecht, pp 115–140.

Boyajian GE, Carreira LH (1997) Phytoremediation: a clean transition from laboratory to marketplace? Nat Biotechnol 15:127–128.

Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM (1995) Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator Thlaspi caerulescens and metal tolerant Silene vulgaris grown on sludge-ammended soils. Environ Sci Technol 29:1581–1585.

Bruce N (2007) Biodegradation and phytoremediation of explosives. In: Mackova M, Macek T, Demnerova K, Pazlar V (eds) Abstracts, 4th Symposium on biosorption and bioremediation, VSCHT Prague, p 77.

Burd GI, Dixon DG, Glick BR (1998) A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Appl Environ Microbiol 64:3663–3668.

Burken J, Xingmao Ma (2006) Phytoremediation of volatile organic compounds. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 199–216.

Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Angle JS, Baker AJM (1997) Phytoremediation of soil metals. Curr Opin Biotechnol 8:279–284

Chroma L, Moeder M, Kucerova P, Macek T, Mackova M (2003) Plant enzymes in metabolism of polychlorinated biphenyls. Fresenius Environ Bull 12:291–295.

Clemens S, Palmgren M, Kraemer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci 7:309–315.

Cunningham SD, Berti WR, Huang JW (1995) Phytoremediation of contaminated soils. Trends Biotechnol 13:393–397.

Czako M, Feng XZ, He Y, Gollapudi S, Marton L (2006) In vitro propagation of wetland monocots for phytoremediation. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation.

Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 217–226.

Donnelly PK, Hedge RS, Fletcher JS (1994) Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. Chemosphere 28:984–988.

Doran PM (1997) Hairy Roots: culture and applications. Harwood, London Doty SL, James CA, Moore AL, Vajzovic A, Singleton GL, Ma C, Khan Z, Xin G, Kang JW, Park AY, Meilan R, Strauss SH, Wilkerson J, Farin F, Strand SE (2007) Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. Proc Natl Acad Sci USA 104:16816–16821.

Eapen S, Singh S, D'Souza SF (2007) Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. Biotechnol Adv 25:442–451.

Fletcher JS, Donnelly PK, Hedge RS (1995) Biostimulation of PCB-degrading bacteria by compounds released from plant roots. In:

Hinchee RE, Anderson DB and Hoeppel RE (eds) Bioremediation of recalcitrant organics. Battelle, Columbus, pp 131–136.

Francova K, Macek T, Demnerova K, Mackova M (2001) Transgenic plants — potential tool for the decontamination of the environment. Chem Listy 95:630–637.

Francova K, Sura M, Macek T, Szekeres M, Bancos S, Demnerova K, Sylvestre M, Mackova M (2003) Preparation of plants containing bacterial enzyme for degradation of polychlorinated biphenyls. Fresenius Environ Bull 12:309–313.

Francova K, Mackova M, Macek T, Sylvestre M (2004) Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from Burkholderia sp. LB400 and Comamonas testosteroni B-356 to catalyse oxygenation of ortho-hydroxybiphenyls formed from PCBs by plants. Environ Pollut 127:41–48.

French CE, Rosser SJ, Davies GJ, Nicklin S, Bruce NC (1999) Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nat Biotechnol 17:491–494.

Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proc Natl Acad Sci USA 96:5973–5977.

Glick B (2006) Modifying a plant’s response to stress by decreasing ethylene production. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 227–236.

Grichko VP, Filby B, Glick BR (2000) Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. J Biotechnol 81:45–54.

Grill E, Loffler S, Winnacker E-L, Zenk MH (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc Nat Acad Sci USA 84:6838–6846.

Harms H, Kottutz E (1990) Bioconversion of xenobiotics in different plant systems - cell suspension cultures, root cultures and intact plants. In: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds) Progress

in plant cellular and molecular biology. Kluwer, Dordrecht, pp 650–655.

Heaton ACP, Rugh CL, Wang N-J, Meagher RB (1998) Phytoremediation of Hg-polluted soils by genetically engineered plants. J Soil Cont 7:497–509.

Hasegawa I, Terada E, Sunairi M, Wakita H, Shinmachi F, Noguchi A, Nakajima M, Yazaki J (1997) Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). Plant Soil 196:277–281.

Janouskova M, Pavlikova D, Macek T, Vosatka M (2005) Influence of arbuscular mycorrhiza on the growth and cadmium uptake of tobacco with inserted metallothionein gene. Appl Soil Ecol 29:209–214.

Kärenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, van der Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI (2000) Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metalpolluted soils. Environ Pollut 107:225–231.

Komives T, Gullner G (2006) Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 23–32.

Kotrba P, Macek T, Ruml T (1999) Heavy-metal binding peptides and proteins in plants. A review. Coll Czech Chem Commun 64:1057–1086.

Krämer U, Chardonnens A (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. Appl Microbiol Biotechnol 55:661–672.

Lasat MM (2000) Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. J Environ Qual 31:109–125.

Leigh MB (2006) Methods for rhizoremediation research. Approaches to experimental design and microbial analysis. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 33–56.

Leigh MB, Prouzova P, Mackova M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS (2006) Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. Appl Environ Microbiol 72:2331–2342.

Leigh MB, Pellizari VH, Uhlik O, Sutka R, Rodrigues J, Ostrom NE, Zhou J, Tiedje JM (2007) Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs). ISME J 1:134–48.

Ma W, Penrose DM, Glick BR (2002) Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. Can J Microbiol 48:947–954.

Macek T. (1989) Poroporo, Solanum aviculare, S. laciniatum: in vitro culture and the production of solasodine. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 7. Springer, Heidelberg, pp 443–467.

Macek T, Kotrba P, Suchova M, Skacel F, Demnerova K, Ruml T (1994) Accumulation of cadmium by hairy root cultures. Biotechnol Lett 16:621–624.

Macek T, Mackova M, Truksa M, Singh-Cundy A, Kotrba P, Yancey N, Scouten WH (1996) Preparation of transgenic tobacco with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail. Chem Listy 90:690.

Macek T, Kotrba P, Ruml T, Skacel F, Mackova M (1997) Accumulation of cadmium by hairy root cultures. In: Doran PM (ed) Hairy roots: culture and application. Harwood, London, pp 133–138.

Macek T, Mackova M, Burkhard J, Demnerova K (1998) Introduction of green plants for the control of metals and organics in remediation. In: Holm FW (ed) Effluents from alternative demilitarization technologies, NATO PS Series 1, vol 12, Kluwer, Dordrecht, pp 71–85.

Macek T, Mackova M, Kucerova P, Burkhard J, Kotrba P, Demnerova K (1999) Phytoremediation – its possible application in chemical weapons demilitarisation. In: Chillcott I (ed) Proceedings of the International congress on chemical weapons demilitarisation, CWD99 Wien, July 1999, DERA UK, pp 865–912.

Macek T, Mackova M, Kas J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. Biotechnol Adv 18:23–35.

Macek T, Mackova M, Pavlikova D, Szakova J, Truksa M, Cundy AS, Kotrba P, Yancey N, Scouten WH (2002) Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. Acta Biotechnol 22:101–106.

Macek T, Francova K, Kochankova L, Lovecka P, Ryslava E, Rezek J, Sura M, Triska J, Demnerova K, Mackova M (2004) Phytoremediation: biological cleaning of a polluted environment. Rev Environ Health 19:63–82.

Macek T, Sura M, Pavlikova D, Francova K, Scouten WH, Szekeres M, Sylvestre M, Mackova M (2005) Can tobacco have potentially beneficial effect to our health? Z Naturforsch [C] 60:292–299.

Macek T, Francova K, Sura M, Mackova M (2006) Genetically modified plants with improved properties for phytoremediation purposes. In: Morel J-L, Echevaria G, Goncharova N (eds) Phytoremediation of metal-contaminated soils. NATO Science Series IV, 68, Springer, Dordrecht, pp 85–108.

Macek T, Kotrba P, Svatos A, Novakova M, Demnerova K, Mackova M (2008) Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. Trends Biotechnol 26:146–152.

Mackova M, Macek T, Burkhard J, Ocenaskova J, Demnerova K, Pazlarova J (1997a) Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells. Int Biodeter Biodegrad 39:317–325.

Mackova M, Macek T, Kucerova P, Burkhard J, Pazlarova J, Demnerova K (1997b) Degradation of polychlorinated biphenyls by hairy root culture of Solanum nigrum. Biotechnol Lett 19:787–790.

Mackova M, Vrchotova B, Francova K, Sylvestre M, Tomaniova M, Lovecka P, Demnerova K, Macek T (2007) Biotransformation of PCBs by plants and bacteria — consequences of plantmicrobe interactions. Eur J Soil Biol 43:233–241.

Marton L, Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort RA (1979) In vitro transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Nature 277:129–131.

McCutcheon SC, Schnoor JL (eds) (2003) Phytoremediation: transformation and control of contaminants. Wiley, Hoboken

Meagher RB (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Curr Opin Plant Biol 3:153–162.

Mejare M, Bulow L (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. Trends Biotechnol 19:67–73.

Mezzari MP, Walters K, Jelinkova M, Shih MC, Just CL, Schnoor JL (2005) Gene expression and microscopic analysis of Arabidopsis exposed to chloroacetanilide herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach. Plant Physiol 138:858–869.

Mohammadi M, Chalavi V, Novakova-Sura M, Laliberte JF, Sylvestre M (2007) Expression of bacterial biphenyl-chlorophenyl dioxygenase genes in tobacco plants. Biotechnol Bioeng 97:496–505.

Montagu MV (2005) Technological milestones from plant science to agricultural biotechnology. Trends Plant Sci 10:559–560.

Morel JL, Chaineau CH, Schiavon M, Lichtfouse E (1999) The role of plants in the remediation of contaminated soils. In: Baveye P (ed) Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer, Dordrecht, pp 429–449.

Nedelkoska TV, Doran PM (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of Thlaspi caerulescens. Biotechnol Bioeng 67:607–615.

Nedelkoska TV, Doran PM (2002) Hyperaccumulation of nickel by hairy root of Alyssum species: comparison with whole regenerated plants, Biotechnol Prog 17:752–759

Nesnerova P, Sebek P, Macek T, Svatos A (2004) First semi-synthetic preparation of sex pheromones. Green Chem 6:305–307.

Novakova M, Mackova M, Chrastilova Z, Prokesova J, Szekeres M, Demnerova K, Macek T (2009) Cloning the bacterial bphC gene into Nicotiana tabacum to improve the efficiency of PCB phytoremediation. Biotechnol Bioeng 102:29–37.

Otte ML, Jacob DL (2006) Constructed wetlands for phytoremediation, rhizofiltration, phytostabilisation and phytoextraction. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on Biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 57–68.

Pan A, Yang M, Tie F, Li L, Chen ZL, Ru B (1994) Expression of mouse metallothionein gene-1 confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. Plant Mol Biol 24:341–351.

Pavlikova D, Macek T, Mackova M, Szakova J, Balik J (2004a) Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail. Int Biodeter Biodegrad 52:233–237.

Pavlikova D, Macek T, Mackova M, Sura M, Szakova J, Tlustos P (2004b) The evaluation of cadmium, zinc, and nickel accumulation ability of transgenic tobacco bearing different transgenes. Plant Soil Environ 50:513–517.

Pilon-Smits E and Pilon M (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. Crit Rev Plant Sci 21:439–456.

Pletsch M, Santos de Araujo B, Charlwood BV (1999) Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. Biotechnol Adv 17:679–687.

Raskin I (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. Proc Natl Acad Sci USA 93:3164–3166.

Rezek J, Macek T, Mackova M, Triska J (2007) Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade Solanum nigrum SNC-9O. Chemosphere 69:1221–1227.

Rezek J, Macek T, Mackova M, Ruzickova K, Triska J (2008) Hydroxy-PCBs, methoxy-PCBs and hydroxy-methoxy-PCBs: metabolites of polychlorinated biphenyls formed in vitro by tobacco cells. Environ Sci Technol 42:5746–5751.

Rittmann BE (2006) Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology. Trends Biotechnol 24:261–266.

Rudolph A, Becker R, Scholz G, Prochazka Z, Toman J, Macek T, Herout V (1985) The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation. Biochem Physiol Pflanzen 180:557–563.

Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic Arabidopsis thaliana plants expressing a modified bacterial merA gene. Proc Natl Acad Sci USA 93:3182–3187.

Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. Nat Biotechnol 16:925–928.

Rulisek L, Havlas Z (2000) Theoretical studies of metal ion selectivity. 1. DFT calculations of interaction energies of amino acid side chains with selected transition metal ions (Co2+, Ni^{2+},Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}). J Am Chem Soc 122:10428–10439.

Rulisek L, Havlas Z (2003) Theoretical studies of metal ion selectivity. 3. A theoretical design of the most specific combinations of functional groups representing amino acid side chains for the

selected metal ions (Co^{2+}, Ni2+, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, and Hg^{2+}). J Phys Chem B 107:2376–2385.

Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Bio Technol 13:468–474.

Sandermann H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the ‘green liver’ concept. Pharmacogenetics 4:225–241.

Schnoor JL, Licht LA, McCutcheon SC, Wolfe NL, Carreira LH (1995) Phytoremediation of organic contaminants. Environ Sci Technol 29:318–323.

Schroeder P, Daubner D, Maier H, Neustifter J, Debus R (2008) Phytoremediation of organic xenobiotics — glutathione-dependent detoxification in Phragmites plants from European treatment sites. Biores Technol 99:7183–7191.

Shanks JV, Morgan J (1999) Plant “hairy root” culture. Curr Opin Biotechnol 10:151–155.

Singer A (2006) The chemical ecology of pollutant biodegradation. Bioremediation and phytoremediation from mechanistic and ecological perspectives. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 5–22.

Singer A, Gilbert ES, Luepromchai E, Crowley DE (2000) Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 54:838–843

Singer A, Crowley DE, Thompson IP (2003) Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. Trends Biotechnol 21:123–130.

Soudek P, Podlipna R, Vanek T (1998) Phytoremediation of heavy metals by hairy root culture of Armoracia rusticana. Int Biodeterior Biodegradration 42:235–236.

Sudova R, Pavlikova D, Macek T, Vosatka M (2007) The effect of EDDS chelate and inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices on the efficacy of lead phytoextraction by two tobacco clones. Appl Soil Ecol 35:163–173.

Tlustos P, Pavlikova D, Szakova J, Fischerova Z, Balik J (2006) Exploitation of fast growing trees in metal remediation. In:

Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 83–102.

Tomaszewski JE, Smitherny DW, Cho YM, Luthy RG, Lowry GV, Reible D, Macek T, Sura M, Chrastilova Z, Demnerova K, Mackova M, Pavlíkova D, Szekeres M, Sylvestre M (2006) Treatment and containment of contaminated sediments. In: Reible D, Lanczos T (eds) Assessment and remediation of contaminated sediments. NATO ASI Series, Springer, Dordrecht, pp 135–178.

Uhlik O, Jecna K, Leigh MB, Mackova M, Macek T (in press) DNA-based stable isotope probing: a link between community structure and function. Sci Total Environ doi: 10.1016/j. scitotenv. 2008. 05. 012 Vain P. (2006) Global trends in plant transgenic science and technology. Trends Biotechnol 24:206–211.

Van Aken B (2008) Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. Trends Biotechnol 26:225–227.

Vanek T, Schwitzguebel J-P (2003) Phytoremediation inventory, COST Action 837 View. UOCHB AVCR, Prague.

Villacieros M, Whelan C, Mackova M, Molgaard J, Sanchez-Contreras M, Lloret J, Aguirre de Carcer D, Oruezabal RI, Bolanos L, Macek T, Karlson U, Dowling DN, Martin M, Rivilla R (2005) PCB rhizoremediation by Pseudomonas fluorescens F113 derivatives using a Sinorhizobium meliloti nod system to drive bph gene expression. Appl Environ Microbiol 71:2687–2694.

Vosatka M (2001) A future role for the use of arbuscular mycorrhizal fungi in soil remediation: a chance for small–medium enterprises? Minerva Biotechnol 13:69–72.

Wevar Oller AL, Agostini E, Talano MA, Capozucca C, Milrad SR, Tigier HA, Medina MI (2005) Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato hairy roots increases phytoremediation of phenols. Plant Sci 169:1102–1111.

Wiessner A, Kuschk P, Kappelmeyer U, Bederski O, Müller RA, Kästner M (2006) Influence of helophytes on redox reactions in their rhizosphere. In: Mackova M, Dowling D, Macek T (eds) Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Focus on biotechnology, vol. 9A. Springer, Dordrecht, pp 69–82.

Wimmer Z, Macek T, Vanek T, Streinz L, Romanuk M (1987) Biotransformation of 2-(4-methoxybenzyl)-1-cyclohexanone by cell cultures of Solanum aviculare. Biol Plant 29:88–93.

فصل پانزدهم

گیاه پالایی خاک‌های بیابانی آلوده به نفت

Samir Radwan

۱۵-۱- مقدمه

نواحی بیابانی و نیمه‌بیابانی بخش نسبتاً زیادی از سیاره ما یعنی حدود یک سوم تا یک چهارم سطح آن را شامل می‌شوند. این نواحی سطح قابل توجهی از همه قاره‌ها بجز اروپا را می‌پوشانند. پراکندگی سطح بیابان‌ها در جهان درحال افزایش است و از منظر اقتصادی این امر یک مشکل جدی است. زمین روز به روز با آلودگی محیط زیست بیشتر تهدید می‌شود و بیابان‌ها سهم چشم‌گیری از این تهدید را به خود اختصاص می‌دهند. احیای محیط زیست زمین که بیابان‌ها هم شامل آن می‌شود، یکی از وظایف ضروری طرفداران محیط زیست در قرن بیست و یکم است.

از آنجا که شروع تولید و استفاده‌ی گسترده از نفت به عنوان منبع انرژی به آغاز قرن بیستم برمی‌گردد، این ماده خام ارزشمند و فرآورده‌ها و مشتقاتش به آلاینده اصلی محیط زیست تبدیل شده است. این امر ممکن است در بیابان‌های دست‌نخورده صدق نکند، اما قطعا در نواحی محدودی که نفت یافت شده و تولید و انتقال آن انجام می‌گیرد، صادق است.

مهم‌ترین هدف این فصل پرده برداشتن از فنّاوری‌هایی است که پتانسیل استفاده در پالایش نواحی بیابانی نفتی را دارند. بنابراین بایستی به دو موضوع مهم در آغاز پرداخته شود: آلودگی بیابان‌ها با نفت و ترکیب نفت خام.

۱۵-۲- خاک‌های بیابانی و آلودگی نفتی

خاک‌های بیابانی با مقدار مواد آلی و رطوبت پایین شناخته می‌شوند که در معرض شرایط محیطی حاد مانند دما و تابش بالا هم هستند. ظاهراً تولیدکنندگان اولیه در این قبیل خاک‌های ضعیف ریزجانداران فوتوتروف یعنی ریز جلبک‌ها و سیانوباکترها هستند. این جانداران در بیشتر زمان زندگی خود به صورت واحدهای زنده وجود دارند و در شرایط ویژه مانند، پس از بارندگی و زمانی‌که دما مناسب رشد آن‌ها باشد، موقتاً فعال می‌شوند. خاک‌های بیابانی عمدتاً بدون آلاینده‌های محیطی مانند آفت‌کش‌ها هستند. اما در نواحی محدودی که تولید و انتقال نفت خام وجود دارد، درجاتی از آلودگی به این ماده خام در خاک دیده می‌شود. آلودگی نفتی گسترده در نواحی بیابانی هم در پی اتفاق‌های خاص یا حتی جنگ، رخ می‌دهد که بعداً شرح داده خواهد شد.

۱۵-۲-۱- میکروفلور بیابانی نرمال

ارائه کاملی از میکروفلور بیابانی روی زمین کار دشواری است چرا که بیابان‌ها مشابه هم نیستند. افزون بر این، هر بیابان نیز موقعیت‌های ناهمگن با شرایط متفاوت و در نتیجه میکروفلور متفاوت دارد. گزارشی درباره ریزجانداران بیابان آتاکاما[1] که یک بیابان قدیمی معتدل در کنار ساحل اقیانوس آرام در آمریکای جنوبی است، منتشر شده است (گومز-سیلوا و همکاران، ۲۰۰۸). اطلاعات این گزارش خلاصه خواهند شد تا این بیابان را تنها به صورت یک مدل نشان دهد. برخی از قسمت‌های این بیابان رسماً بدون باکتری است، در حالی‌که در برخی قسمت‌ها بیش از $۱۰^{۷}$ یاخته در هر گرم خاک وجود داشت. این تفاوت بزرگ به تفاوت در فاکتورهای محیطی غالب مانند سطح بارش‌ها، ترکیب شیمیایی خاک، ارتفاع، pH و دیگر فاکتورها بستگی دارد. روشی که برای شمارش باکتری‌ها به کار رفت هر دو روش مبتنی بر کشت میکروب‌ها و مستقل از کشت آن‌ها را شامل می‌شد (ناوارو-گونزالس و همکاران، ۲۰۰۳؛ مِیِر و همکاران، ۲۰۰۴؛ گالوین و همکاران، ۲۰۰۴، دریس و همکاران، ۲۰۰۶؛ لستر و همکاران، ۲۰۰۷). بیشتر باکتری‌های جدا شده از خاک این بیابان متعلق به اکتینوباکترها[2] و فرمیکیوت‌ها[3] بودند و شمار پروتئوباکترها بسیار کم بود. در بعضی جاهای خاص اکتینوباکترها از خانواده‌های *جئودرماتوفیلاسه*[4] و جنس‌های *اسفینگوموناس*، *باسیلوس*، *آرتروباکتر*، *بِرِوی‌باسیلوس*[5]، *کوکوریا*[6]، *سلولوموناس*، و *هایمنوباکتر*[7] بودند. بعداً خواهیم دید که بیشتر این باکتری‌ها قابلیت استفاده از نفت و هیدروکربن‌ها را دارند. در پژوهش‌های بالا تنوع میکروبی در لایه رویین و زیرین خاک یکسان بود.

سنگ فرش بیابانی[8] (خاک پوشیده شده با شن‌ها) با باکتری‌های هایپولیتیک[9] و اندولیتیک[10] رشد کرده و به صورت بیوفیلم کلنی تشکیل دادند (وارن-رودس و همکاران، ۲۰۰۶؛ وایرشوز و همکاران، ۲۰۰۶). مجموعه باکتری‌های مشابه همچنین در سایر بیابان‌های سرد و داغ دیده شده است (فریدمن، ۱۹۹۲؛ شلزینگر و همکاران، ۲۰۰۳). سیانوباکترهای ساکن در سنگ‌های سست ومتخلخل، تولیدکنندگان اولیه عمده در این مجموعه‌ها هستند.

---

1. Atacama
2. *Actinobacteria*
3. *Firmicutes*
4. Geo-dermatophilaceae
5. *Brevibacillus*
6. *Kocuria*
7. *Hymenobacter*
8. Desert pavement
9. Hypolithic
10. Endolithic

۱۵-۲-۲- نفت خام

اگرچه نفت در عصر جدید کشف شد وکاربرد گسترده پیدا کرد، اما از قرن‌ها پیش در زمین وجود داشته است. نفت از زیست توده جانداران دریایی که در زمان‌های زمین‌شناسی دفن شده و در شرایط بی‌هوازی قرار گرفته‌اند، به وجود آمده است. در طول زمان بیشتر اجزای آلی دچار تجزیه زیستی شده و مولکول‌های پایداری که بیشتر هیدروکربن‌ها هستند را در مخازن زمینی برجای می‌گذارد.

نفت خام از چهار بخش اصلی تشکیل شده است (لیهی و کالول، ۱۹۹۰): هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک، آسفالتن‌ها و رزین‌ها. اگرچه مقدار این بخش‌ها تغییرات معنی‌داری در نمونه‌های خام به دست آمده از منابع مختلف دارند، اما هیدروکربن‌های اشباع معمولا جزء غالب در همه آن‌ها هستند. این جزء از آلکان‌های نرمال با زنجیره‌های بیش از ۴۰ اتم کربن و نفتالن‌ها که آلکان‌های حلقوی هستند، تشکیل شده است و بیش از ۶۰ درصد نفت سبک را تشکیل می‌دهد. بخش هیدروکربن‌های آروماتیک شامل بنزن و مشتقات بنزن هستند و ممکن است بیش از ۲۰ درصد نفت سبک را تشکیل دهند. مولکول‌ها در این بخش دارای یک تا بیش از ۶ حلقه هستند. بخش آسفالتن‌ها شامل هیدروکربن‌های با وزن مولکولی بسیار بالا بوده و در بخش رزین‌ها هم افزون بر کربن و هیدروژن، گوگرد و اکسیژن هم حضور دارند. بدیهی است که آسفالتن‌ها و رزین‌ها نسبتاً پیچیده هستند و ترکیب شیمیایی آن‌ها به طور دقیق مشخص نشده است. این دو بخش بین ۱ تا ۵ درصد نفت سبک را تشکیل می‌دهند. در سوی دیگر در نفت سنگین بیش از ۲۵ درصد آسفالتن و رزین وجود دارد.

۱۵-۲-۳- آلودگی خاک بیابان با نفت

بقایای آلی خاک به طور طبیعی هیدروکربن کمی دارند که منشأ آن اجزای طبیعیِ میکرو و ماکرو فلور و فونای ساکن در خاک است. از آنجا که خاک بیابان‌ها به طور طبیعی ماده آلی کمی دارد، انتظار می‌رود که هیدروکربن آن نیز به طور طبیعی اندک باشد و این امر یک وضعیت طبیعی است. خاک نواحی بیابانی کشورهای تولیدکننده نفت با سطوح بالایی از بخارهای هیدروکربن‌ها مواجه هستند که از مخازن نفتی حفر شده در عمق می‌آیند. اما مسئله آلودگی نفتی در این نواحی بیابانی با توجه بیشتر به این ماده خام، به عنوان منبع انرژی در عصر جدید در ارتباط است. تولید و انتقال نفت در مقیاس وسیع سبب نشت نفت در اندازه‌های متفاوت شد. تصادف‌ها و جنگ‌ها نیز در این مناطق وضعیت را بدتر کرد. به عنوان یک نمونه، فاجعه نشت نفت در خاک کویت با تهاجم عراق به کویت و اشغال آن (آگوست ۱۹۹۰ تا فوریه ۱۹۹۱) رخ داد. به طور خلاصه، نیروهای عراقی پیش از اینکه مجبور به عقب‌نشینی شوند، بیش از ۷۰۰ چاه نفت در خاک کویت را منفجر کردند. بر اساس

برآوردهای قابل اعتماد، در طی ۷ ماهی که طول کشید تا مقامات بتوانند آتش را مهار کنند، حدود ۲۲ میلیون بشکه نفت خام نشت کرد. نشت نفت از این چاه‌ها ۳۰۰ دریاچه نفتی با ابعاد مختلف ایجاد کرد که در مجموع ۴۹ کیلومتر مربع در سطح بیابان وسعت داشتند که برای کشوری کوچک سطح وسیعی است. خاک بستر دریاچه‌ها به شدت (۱۰- ۲۰ درصد) و نواحی پیرامون آن‌ها هم نسبتاً (کمتر از ۱۰ درصد) آلوده شد. طبق گزارش شرکت نفت کویت حدود ۱۹ میلیون بشکه نفت از این دریاچه‌ها بازیابی و صادر شد و حدود ۳ میلیون بشکه در زمین فرو رفت و تا عمق ۴۰ تا ۶۰ سانتی‌متری خاک را آلوده کرد.

۱۵-۲-۴- ریزجانداران تغذیه کننده از نفت

از دهه ۱۹۷۰ بیشتر بررسی‌ها و گزارش‌های منتشر شده درباره‌ی میکروب‌های تغذیه کننده از نفت بوده‌اند (کلاگ و مارکووتز، ۱۹۷۹؛ لی‌وای و همکاران، ۱۹۷۹؛ اینسله، ۱۹۸۳؛ رادوان و سورکوه، ۱۹۹۳؛ ون‌هامه و همکاران، ۲۰۰۳؛ روزنبرگ، ۲۰۰۶؛ ویدل و همکاران، ۲۰۰۶؛ رادوان، ۲۰۰۸). بر اساس این گزارش‌ها و موارد مشابه دامنه گسترده‌ای از ریزجانداران معمول پروکاریوت و یوکاریوت پتانسیل استفاده از نفت (یا هیدروکربن) را دارند. ویژگی مشخص زیست شیمیایی این ریزجانداران داشتن سامانه اکسیژناز است که وارد کردن اتم اکسیژن از مولکول اکسیژن به مولکول‌های هیدروکربنی آروماتیک و آلیفاتیک را کاتالیز می‌کند و از آن‌ها الکل‌های متناظر را می‌سازد. این مرحله اکسیداسیون بیشتر الکل به اسید از طریق تبدیل به آلدهید را هموار می‌کند که در ادامه اسید به روش معمول متابولیزه شده و انرژی و مواد یاخته‌ای ایجاد می‌کند (برای بررسی در این زمینه به رهم و ریف، ۱۹۸۱؛ فوکویی و تاناکا، ۱۹۸۱، بولتون و راتلج، ۱۹۸۴ مراجعه شود). جنس‌های باکترهایی که از آن‌ها بیشتر به عنوان تجزیه کنندگان هیدروکربن نام برده شده است، شامل: *اسینتوباکتر*، *آئروموناس*، *آلکالیجنز*، *آرتروباکتر*، *آزواسپریلیوم*، *باسیلوس*، *بِروِی باکتریوم*، *کروموباکتریوم*، *کورینه باکتریوم*، *فلاووباکتریوم*، *کلبسیلا*، *میکروکوکوس*، *مایکوباکتریوم*، *نوکاردیا* (و سایر نوکاردیافورم‌ها)، *سودوموناس*، *رودوکوکوس*، *ویبریو* و *استرپتومایسس* هستند. مخمرهایی که بیشتراز آن‌ها نام برده شده، شامل: *کاندیدا*، *دابارومایسس*[1]، *اندومایسس*[2]، *لئوکواسپوریدیوم*[3]،

1. *Dabaromyces*
2. *Endomyces*
3. *Leucosporidium*

لودرومایسس[1]، *متچینکوویا*[2]، *پیچیا*، *رودواسپوریدیوم*[3]، *رودوتورولا*[4]، *ساکارومایکوپسیس*[5]، *شوانیومایسس*[6]، *سلنوتیلا*[7]، *اسپوریدیوبالوس*[8]، *اسپوروبولیسس*[9]، *تورولوپسیس*، *تریکواسپورون*[10] و *واینگا*[11] هستند. قارچ‌هایی که بیشتر ثبت شده‌اند نیز شامل *ابسیدیا*، *آسپرجیلوس*، *آروبازیدیوم*، *بیووریا*، *بوتریتیس*، *سفالوسپوریوم*، *کلادوسپوریوم*، *کورلواسپورا*، *کانینگهاملا*، *دندیفیلا*، *فوزاریوم*، *هورمودندروم*، *لولورثیا*، *مورتیرلا*، *موکور*، *پنیسیلیوم*، *فیولوفورا*، *فما*، *اسکودوسپوریوم*، *اسکولئوبازیدیوم*، *اسپوروتریکوم*، *واریکواسپورینا* و *ورتیسیلیوم* هستند. افزون بر ریزجانداران ارگانوتروف بالا درمنابع گزارش‌هایی درباره‌ی ریزجانداران فوتوتروف هم وجود دارد که ادعا شده آن‌ها هم پتانسیل اکسیداسیون هیدروکربن‌ها را دارند. از فوتوتروف‌ها هم می‌توان جنس‌های *رودواسپریلیوم*، *رودوسودوموناس* (سرنیگلیا و همکاران، ۱۹۸۰b)، سیانوباکتر *اسیلاتوریا*[12] (سرنیگلیا و همکاران، ۱۹۸۰a)، *میکروکولئوس* و *فورمدیوم* (ال-حسن و همکاران، ۱۹۹۴؛ رادوان و همکاران، ۱۹۹۸b)، ریزجلبک *کلامیدوموناس* و *کلرلا* (الیس، ۱۹۷۷) و تاژک‌دار *اوگلنا* را نام برد.

برخی از ریزجانداران استفاده کننده از هیدروکربن‌ها ممکن است در طی رشد روی این ترکیب‌ها به عنوان سوبسترا ویژگی‌های ریخت‌شناسی و یاخته‌ای ویژه از خود نشان دهند. یکی از مواردی که در میکروگراف الکترونی نگاره زیاد هم دیده می‌شود، کیسه‌های با تراکم کم الکترون (کم چگال) در سیتوپلاسم هستند که در آن‌ها هیدروکربن‌ها انباشته شده‌اند (اسکات و فاینرتی، ۱۹۶۶؛ اتلس و هاینتز، ۱۹۷۳؛ کندی و فاینرتی، ۱۹۷۵؛ کاندل و همکاران، ۱۹۷۶؛ کوال و ردچیتز، ۱۹۷۸؛ ردچیتز، ۱۹۸۰؛ باراباس و همکاران، ۱۹۹۵). در برخی ریزجانداران رشد روی هیدروکربن‌ها با ظهور غشای درون یاخته‌ای متراکم در سیتوپلاسم (کندی و فاینرتی، ۱۹۷۵؛ ایوشینا و همکاران، ۱۹۸۲) و همین‌طور اندوخته ولوتین (ردچیتز و کوال، ۱۹۷۹؛ ایوشینا و همکاران، ۱۹۸۲) مرتبط است. در محیط‌های مایع دارای هیدروکربن به عنوان سوبسترا، *پنیسیلیوم* به صورت توپ‌های

1. *Lodderomyces*
2. *Metschnikowia*
3. *Rhodosporidium*
4. *Rhodotorula*
5. *Saccharomycopsis*
6. *Schwanniomyces*
7. *Selenotila*
8. *Sporidiobalus*
9. *Sporoboloyces*
10. *Trichosporon*
11. *Wingea*
12. *Oscillatoria*

توخالی که قطره‌های هیدروکربن را احاطه کرده بودند، رشـــد کردند و در محیط بدون هیدروکربن، توپ‌ها توپر بودند (کاندل و همکاران، ۱۹۷۶).

اطلاعات درباره ریزجانداران اســـتفاده کننده از هیدروکربن‌ها در خاک بیابان در مقیاس جهانی کم است. ولی با این حال درباره نواحی بیابانی خاص اطلاعاتی موجود است. یک نمونه از این موارد، محیط بیابانی کویت (احتمالاً کل ناحیه خلیج فارس) اســت که میکروفلور تجزیه کننده هیدروکربن آن در اینجا شـــایســـته توجه اســـت. باکتری‌ها و قارچ‌های بومی تجزیه کننده نفت در خاک بیابانی کویت در جدول ۱۵-۱ آمده است. در نمونه‌های غیرآلوده، خاک شمار آن‌ها کم و در محدوده‌ی صد تا هزار جاندار در هر گرم خاک اســت. اما در نمونه‌های خاک آلوده، تعداد آن‌ها به بیش از ده تا صد میلیون در هر گرم خاک می‌رســـد (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵c). رایزوســـفر گیاهان طبیعی بیابانی رشـد کرده در خاک غیرآلوده و خاک آلوده به نفت، نسـبت به خاک دورتر از ریشه، به مراتب دارای جمعیت بیشتری از ریزجانداران تغذیه کننده از نفت بود (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵b؛ ۱۹۹۸a). این امر برای نمونـه‌های خاک بیابانی دارای گیاهان لگوم مانند باقلا[1] و لوپن[2] هم صـــادق بود (رادوان و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ۱۵-۱ ریزجانداران غالب تجزیه کننده نفت در خاک بیابانی کویت

گروه میکروبی	جنس	منبع
باکتری‌ها	*آرتروباکتر*، *باسیلوس*، *میکروکوکوس*، *سودوموناس*، *رودوکوکوس* و سایر نوکاردیافورم‌ها	Sorkhoh et al. (1990, 1995); Radwan et al. (1997)
اکتینومایست‌ها	*استرپتومایسس*	Barabas et al. (1995); Radwan et al. (1998b)
مخمرها	*آسپرژیلوس*، *فوزاریوم*، *موکور*، *پنیسیلیوم*	Sorkhoh et al. (1990)

در رایزوســـفر گیـاهـان بیـابانی کویت جنس‌های تجزیه کننده نفت غالب شـــامل *آرتروباکتر*، *سـلولوموناس* و *رودوکوکوس* بودند. چون ناحیه خلیج فارس تابستان داغ بسیار طولانی دارد، ممکن اسـت خاک برای سـکونت ریزجانداران گرمادوست تجزیه کننده نفت هم مناسب باشد. بررسی چند نمونه خاک از این منطقه از ده تا هزار و تا میلیون از گرمادوسـت‌ها (با دمای بهینه رشـد ۵۵ درجه سـلسـیوس) در هر گرم خاک را نشـان داد که متعلق به *باسـیلوس اسـتروترموفیلوس* (که امروزه *جئوباسـیلوس اسـتروترموفیلوس*[3] نامیده می‌شود) بودند (سورکوه و همکاران، ۱۹۹۳). باکتری دیگر

1. *Vicia faba*
2. *Lupinus albus*
3. *Geobacillus stearothermophilus*

گرمادوست تجزیه کننده نفت که از سایر محیط‌ها جدا شده است، *ترمولئوفیلوم آلبوم*[1] بود (زاریلا و پری، ۱۹۸۴). در این زمینه دیده شد که شن‌های ساحلی کویت دارای شمار کمی از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن قلیادوست و نمک‌دوست بود (ال-عیوضی و همکاران، ۲۰۰۷) که در جدول ۱۵-۲ آمده است.

جدول ۱۵-۲ جنس‌های باکتریایی قلیادوست و نمک‌دوست در نواحی بیابانی ساحلی کویت

باکتری‌های قلیادوست	باکتری‌های نمک‌دوست
مارینوباکتر	*مارینوباکتر*
میکروکوکوس	*میکروباکتریوم*
اُشَینوباسیلوس[2]	*جورجینیا*[3]
باسیلوس	*اِستاپیا*[4]
دایتزیا	*باسیلوس*
سیتریکوکوس[5]	*سلولوموناس*

توجه: جنس‌های باکتریایی با توجه به شمار غالب به صورت نزولی در ستون‌ها آورده شده‌اند.

۱۵-۲-۵- پاک‌سازی خاک بیابانی نفتی

روشن است که پاک‌سازی خاک بیابانی که در معرض حجم زیادی از نشت نفت قرار گرفته است، کار نسبتاً سختی است. روش‌های فیزیکی برای حذف نفت با نفوذ آن به عمق‌هایی که ممکن است به ۶۰ سانتی‌متر هم برسد، مانند موردی که در خاک کویت و پس از جنگ ۱۹۹۱ رخ داد، پیچیده می‌شود. در آن مورد خاص که در بالا اشاره شد، مقدار نفت خام نشت شده به اندازه‌ای زیاد بود که دریاچه‌های نفتی تشکیل شد. برداشت مکانیکی از این دریاچه‌ها تا اندازه‌ای موفق بود و چیزی حدود ۱۹ میلیون بشکه بازیابی و صادر شد اما حدود سه میلیون بشکه در بستر دریاچه باقی ماند، ضمن اینکه مقداری هم درون شن نفوذ کرده بود (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵a). کل خاک آلوده شده به نفت حدود بیست میلیون متر مکعب برآورد شده است. تنها راه رهایی بیابان از این آلودگی اتکا به فعالیت میکروبی یا به روش خودپاک‌سازی[6] یا به شیوه فنّاوری زیست‌پالایی است. روش دوم در بخش بعدی بحث خواهد شد. خودپاک‌سازی فرایندی طبیعی است که در آن آلاینده‌ها در

1. *Thermoleophilum album*
2. *Oceanobacillus*
3. *Georgenia*
4. *Stappia*
5. *Citricoccus*
6. Self-cleaning

معرض میکروفلور بومی قرار می‌گیرد تا بدون دخالت انسان آن را تجزیه کنند. به هر حال با توجه به طبیعت سخت محیط بیابانی به ویژه در ناحیه خلیج که در فعالیت میکروبی آهسته‌ی آن منعکس می‌شود، بایستی انتظار داشت که فرایند خود پاک‌سازی بسیار کند باشد یا تنها در دوره‌ی کوتاهی از سال رخ دهد. باتوجه به خشکی، فعالیت میکروبی که پالایش زیستی نفت هم شامل آن می‌شود، تنها در دوره‌های کوتاه بارندگی در سطح رضایت‌بخشی رخ می‌دهد (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵c). همین‌طور می‌دانیم که هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی مصرف می‌شوند اما برای ساخت پروتئین و اسید نوکلئیک به مقدار بیشتر نیتروژن نیاز است (اتلس و بارتا، ۱۹۷۲؛ گیبس، ۱۹۷۵؛ گیبس و همکاران، ۱۹۷۵). خاک‌های بیابانی از نظر نیتروژن فقیرند و بدون کوددهی نیتروژنی تجزیه نفت در آنجا بسیار محدود خواهد بود. افزون بر این، دمای بیابان در تابستان برای میکروفلور میانه‌دوست بسیار بالا است و احتمالاً این امر سبب کاهش شدت معدنی شدن نفت خواهد شد. از سوی دیگر، در شب‌های زمستان دمای پایین جلوی این فعالیت‌ها را می‌گیرد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که ترکیب‌های ساده کربن آلی در خاک سبب افزایش استفاده میکروفلور از نفت و افزایش تجزیه زیستی نفت می‌شود (رادوان و همکاران، ۲۰۰۰b). خاک‌های بیابانی از نظر این گونه ترکیب‌های آلی فقیرند. به دیگر سخن، خودپاک‌سازی خاک بیابانی آلوده به نفت به طور معمول با سرعت نسبتاً کم رخ می‌دهد. هدف پروتکل‌های زیست‌پالایی برای این قبیل خاک‌ها بایستی مدیریت ساده و اقتصادی راهم دربر بگیرد تا بتواند این شرایط را بهبود بخشد و بنابراین میکروفلور بومی را تقویت کند.

۱۵-۳- زیست‌پالایی

طبق تعریف، زیست‌پالایی یک فنّاوری زیستی است که در آن برای معدنی شدن و حذف آلاینده‌های زیست‌بیگانه از ریزجانداران استفاده می‌شود (اتلس و پرامر، ۱۹۹۰). اساس تئوریک زیست پالایی از آغاز دهه ۱۹۹۰ به طور مکرر بحث و بررسی شده است (هینچی و اُلفن باتل، a، b۱۹۹۱؛ رایسر-رابرتز، ۱۹۹۲؛ روزنبرگ، ۱۹۹۳؛ الکساندر، ۱۹۹۴؛ استونر، ۱۹۹۴؛ اتلس، ۱۹۹۵؛ رادوان و همکاران، ۱۹۹۵c؛ رادوان، ۲۰۰۸). همین‌طورگزارش‌هایی درباره‌ی زیست‌پالایی محیط‌های نفتی هم وجود دارد (مولر و همکاران، ۱۹۹۸؛ سانگ و همکاران، ۱۹۹۰؛ هینچی و اُلفن باتل، a، b۱۹۹۱).

زیست‌پالایی شامل دو روش است؛یکی تقویت فعالیت میکروفلور بومی تجزیه کننده نفت (تحریک زیستی) ودیگری مایه‌زنی محیط نفتی با ریزجانداران غیربومی تجزیه کننده نفت. برآورد این دو هدف در عمل به هیچ وجه آسان نیست و به ویژه در مورد هدف دوم نگرانی‌هایی هم وجود دارد. تحریک زیستی ریزجانداران استفاده کننده از نفت در خاک نفتی از راه مدیریت مناسب کشاورزی امکان‌پذیر است. بنابراین با برگرداندن گه‌گاه خاک بایستی تهویه را بهبود بخشید. با

آبیاری بایستی سطح رطوبت، بالا رود که با زه آب فاضلاب تیمار شده امکان‌پذیر است. کوددهی به ویژه با کودهای نیتروژنی و مواد آلی ساده تجزیه شونده با روش‌های مرسوم امکان‌پذیر است. اسیدیته زیاد خاک را می‌توان با آهک‌دهی خنثی کرد. با این وجود، انجام این کارها هم بی‌دردسر نیست. زیرا معمولاً دسترسی به مناطق بیابانی آلوده به نفت دشوار است.

از نظر فنی خاک‌های آلوده به نفت را می‌توان به سادگی توسط ریزجانداران مصرف کننده هیدروکربن مایه‌زنی کرد.اما نمی‌توان همیشه تضمین کرد که سویه‌های مایه‌زنی شده در خاک‌های آلوده جاگیر شوند. ترکیب‌های تجاری از ریزجانداران استفاده کننده از نفت را می‌توان خریداری و در منطقه استفاده کرد (انجمن تیمار زیستی کاربردی، ۱۹۸۹، ۱۹۹۰). به هر حال بین میکروب‌شناسان پذیرفته شده است که سویه مایه‌زنی شده معمولاً توان رقابتی ضعیفی با جمعیت میکروبی غالب خاک دارد.

تجربه کار در مناطق بیابانی آلوده کویت نشان داد که با کاشت گیاهان مناسب در این مناطق (یعنی از راه پالایش گیاهی) که به فنّاوری رایزوسفر مرتبط است، در عمل می‌توان به آسانی به هر دو هدف یعنی تحریک زیستی و مایه‌زنی رسید (رادوان، ۱۹۹۰).

۱۵-۴- گیاه‌پالایی با فنّاوری رایزوسفر

همان‌گونه که از نامش پیدا است گیاه‌پالایی شامل بهره‌گیری از گیاهان برای پاک‌سازی آلاینده‌های خاک است. در بیشتر موارد مانند گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین، گیاهان این آلاینده‌ها را جذب کرده، و در خود انباشته یا تصعید می‌کنند. از سوی دیگر، نفت و فرآورده‌های نفتی در آب نامحلول‌اند و شواهدی مبنی بر اینکه ریشه گیاهان این ترکیب‌ها را جذب می‌کنند، دیده نشده است. در واقع، گیاه‌پالایی خاک‌های نفتی به معنی به کار گرفتن فعالیت میکروفلور رایزوسفری به جای خود گیاهان است. از آنجا که گیاهان پیامد مستقیم بر خاک رایزوسفری خود دارند، که در بخش بعدی خواهد آمد، نقش آن‌ها در گیاه‌پالایی خاک‌های نفتی، اگرچه غیرمستقیم است اما کاملاً مهم است.

۱۵-۴-۱- محیط رایزوسفر

رایزوسفر لایه نازکی از خاک است که مستقیماً سامانه ریشه را پوشش می‌دهد و به آن می‌چسبد. اندازه و مقدار رایزوسفر با توجه به نوع ریشه تغییر می‌کند. ریشه‌های فیبری نسبت به ریشه‌های نازک سطح تماس بیشتری ایجاد می‌کنند (پائول و کلارک، ۱۹۹۶).

با توجه به اینکه محیط رایزوسفر مستقیماً تحت تاثیر گیاه است، کاملاً از محیط خاک غیر رایزوسفری متفاوت است. به طور کلی محیط رایزوسفری برای حیات میکروبی مناسب‌تر از خاک

غیر رایزوسفری است. می‌دانیم که گیاهان عالی، اکسیژن را از بخش‌های هوایی از طریق ریشه‌ها به خاک پمپ می‌کنند. بنابراین، محیط رایزوسفری تهویه بهتری از بقیه بخش‌های خاک دارد (کرل و تروئلو، ۱۹۸۶). مقدار رطوبت رایزوسفر هم بالاتر از جاهای دیگر خاک است. زیرا ریشه‌های گیاهان این ریزمحیط نازک را اغلب در حد همان گیاه مرطوب نگه می‌دارند. این فاکتور به ویژه برای میکروفلور خاک در نواحی خشک و نیمه‌خشک مهم است. رایزوسفر همچنین نسبت به خاک دورتر از ریشه، سرشار از ماده آلی است. بیش از ۲۰ درصد از مواد تولید شده در فتوسنتز به صورت تراوش‌های ریشه‌ای در محیط رایزوسفر رها می‌شوند (وِورک و کمپبل، ۲۰۰۲).

تراوش‌های ریشه‌ای گیاهان، که ظاهراً سبب تقویت میکروفلور رایزوسفری می‌شود، شامل: کربوهیدرات‌های ساده، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، تانن‌ها، آلکالوئیدها، فسفاتیدها و دیگر مواد آلی شناسایی نشده است (کرل و تروئلو، ۱۹۸۶؛ کنائبل و وستال، ۱۹۹۴؛ ساتو، ۱۹۹۴؛ پائول و کلارک، ۱۹۹۶؛ اتلس و بارتا، ۱۹۹۸). افزون بر این می‌دانیم که در طی رشد، یاخته‌های ریشه موسیژل تراوش می‌کنند که نقش روان‌کننده برای نفوذ ریشه بین ذرات سخت خاک دارد. این امر به ویژه در گیاهان جوان رخ می‌دهد. با رسیدن گیاهان به بلوغ، خودزوالی[1] برخی ازاجزای ریشه رخ می‌دهد که سبب غنی شدن بیشتر محیط رایزوسفر با قندهای ساده و آمینواسیدها می‌شود (اتلس و بارتا، ۱۹۹۸). جالب است که برخی باکتری‌های رایزوسفری مانند *سودوموناس پوتیدا* (که از تجزیه‌کنندگان معمول هیدروکربن‌ها است) و *آزواسپریلیوم‌ها* (تثبیت کننده غیرهمزیست نیتروژن) سبب افزایش رهاسازی ترکیب‌های آلی ساده توسط ریشه گیاهان می‌شوند (کرل و تروئلو، ۱۹۸۶). دیگر گروه ریزجانداران رایزوسفری هم در تقویت این ریزمحیط با عناصر مختلف نقش دارند. ریشه‌هایی که با ریزجانداران زنده احاطه شده‌اند، تراوش‌های آلی بیشتری از ریشه‌های استریل ایجاد می‌کنند (شان و بویلِ، ۱۹۹۴). ریزجانداران رایزوسفری ممکن است در تولید عناصر ضروری نقش مستقیم داشته باشند. نمونه بارز آن، باکتری‌های گره در ریشه لگوم‌ها و دیازوتروف‌های[2] غیرهمزیست که رایزوسفر را با نیتروژن تثبیت شده تقویت می‌کنند، است. رایزوسفر همچنین محل سکونت «رایزوباکتری‌های افزاینده رشد گیاهی»[3] است که همان گونه که از نامشان پیدا است، از راه تولید عناصر غذایی و اکسین‌ها[4] و با تسهیل انتقال عناصر در غشا، رشد گیاهان را افزایش می‌دهند (ژانگ و همکاران، ۱۹۹۶، ۱۹۹۷؛ گلیک، ۲۰۰۳؛ رادوان و همکاران، ۲۰۰۵b).

---

1. Autolysis
2. Diazotrophs
3. Plant growth promoting rhizobacteria
4. Auxins

۱۵-۴-۲- میکروفلور رایزوسفر

شـرایط محیطی مطلوب در رایزوسـفر در مقایسه با خاک غیررایزوسفری در افزایش تعداد و فعالیت زیسـتی میکروبی منعکس می‌شـود (کرل و تروئلو، ۱۹۸۶). تعداد بیشـترِ ریزجانداران رایزوسفری با افزایش فاصـله از ریشـه به گونه پایداری کاهش می‌یابد. مفهوم «اثر رایزوسـفری» که نسـبت شمار میکروب‌ها در رایزوسـفر به شـمار آن‌ها در خاک غیررایزوسفری است، معمولاً بین ۵ تا ۲۰ بوده اما می‌تواند به بیش از ۱۰۰ یا بیشتر هم برسد (اتلس و بارتا، ۱۹۹۸).

رایزوسفر گیاهان مختلف ابتدا با باکتری‌های گرم-منفی میله‌ای کلنی تشکیل می‌دهد (به اتلس و بارتا، ۱۹۹۸ مراجعه شـود). *سـودوموناس‌های* متحرک با رشـد سریع به وفور در خاک رایزوسفری نسـبت به خاک غیررایزوسفری دیده می‌شوند. ظاهراً این تفاوت به پیامد مستقیم تراوش‌های ریشه گیاهان نسـبت داده می‌شـود که سـبب افزایش رشـد میکروبی می‌شـود. باکتری‌های افزاینده رشد گیاهان که در بالا به آن‌ها اشاره شد و بیشتر از دسته *سودوموناس‌ها* هستند هم، در رایزوسفر کلنی تشکیل می‌دهند (پولوننکو و همکاران، ۱۹۸۷؛ ژانگ و همکاران، ۱۹۹۶، ۱۹۹۷).

ریزجانداران رایزوسـفری پتانسـیل متابولیزه کردن بیشـتر ترکیب‌های زیسـت‌بیگانه را دارند (والتون و اندرسـون، ۱۹۹۰؛ بویله و شـان، ۱۹۹۵). افزون بر این، پوشـش گیاهی در خاک آلوده احتمالاً جابه جایی آلاینده به بیرون از مکان آلوده توسـط فرسـایش بادی یا آبی را کاهش می‌دهد. در سـوی دیگر، برخی مسـائل را می‌توان به پوشـش گیاهی که ابزاری برای پایداری خاک و پالایش زیسـتی اسـت، نسـبت داد. بنابراین حضور بیشتر آلاینده‌هایی که برای گیاه سمی هستند، یا حضور متابولیت‌هایشـان در خاک، با انباشـته شـدن در گیاه ممکن اسـت به زنجیره غذایی منتقل شـوند (فندر، ۱۹۹۶؛ رادوان و همکاران، ۲۰۰۰a). با این حال فرض بر این است که باکتری‌های رایزوسفری تجزیه کننده علف‌کش‌ها ممکن است گیاه کشت شده در خاک آلوده به این علف‌کش‌ها را محافظت کند (اندرسون و همکاران، ۱۹۹۴). همین‌طور گزارش شده که سویه‌ای از *سودموناس* مقاوم به سرب اگر با دانه‌های گندم تیمار شـود، با یک سـازوکار ناشناخته جذب این فلز سنگین توسط جوانه‌ها را کاهش می‌دهد (حسنین و همکاران، ۱۹۹۳).

۱۵-۴-۳- گیاه‌پالایی ترکیب‌های زیست‌بیگانه

شـایـد بهتر بـاشـد پیش از بررسـی پژوهش‌های گیاه‌پالایی خاک‌های بیابانی نفتی، ابتدا به این پژوهش‌ها درباره ترکیب‌های رایج زیسـت‌بیگانه بپردازیم. البته یادآوری می‌شـود که بیشـتر این آلاینده‌ها نیز در حقیقت مشتقات هیدروکربن‌ها هستند.

شـمار نسبتاً زیادی از کارهای پژوهشی درباره تجزیه زیستی آفت‌کش‌ها در رایزوسفر بسیاری از گونه‌های گیاهی منتشـر شـده اسـت (برای بررسـی‌های قدیمی نگاه کنید به اندرسـون و همکاران،

۱۹۹۳، ۱۹۹۴؛ اتلس و بارتا، ۱۹۹۸). در بیشتر این پژوهش‌ها افزایش تجزیه زیستی آلاینده‌ها در رایزوسفر در مقایسه با خاک کشت نشده، به بالا رفتن فعالیت میکروبی نسبت داده شده است. افزون بر این، در بیشتر موارد بالا بودن پتانسیل تجزیه زیستی در رایزوسفر با بالا بودن شمار ریزجانداران تجزیه کننده آفت‌کش همبستگی داشته است. بنابراین برای نمونه رایزوسفر ذرت، لوبیا و پنبه تیمار شده با تمیک[1] (یا آلدیکارب) (۲-متیل-۲(متیل‌تیول) پروپیون آلدهید اُ-(متیل کرباموبل) اُکسیم) دارای باکتری تجزیه‌کننده تمیک بیشتری نسبت به خاک تیمار نشده بود (عبدالناصر و همکاران، ۱۹۷۹). در رایزوسفر ذرت نسبت به خاک غیر رایزوسفری، حتی پس از برداشت بخش‌های هوایی گیاه، تجزیه زیستی بیشترِ آترازین (z-کلرو-۴-اتیل‌آمینو-۶-ایزوپروپیل آمینو-S-تریازین) دیده شد (سیبرت و همکاران، ۱۹۸۱). در عین حال، شمار ریزجانداران تجزیه کننده آفت‌کش‌ها در رایزوسفر بیشتر از خاک غیر رایزوسفری بود. نتایج همانندی درباره گیاه برنج تیمارشده با پاراتیون[2] (O، O-دی اتیل-P-O-نیتروفنیل فسفوروتیوات) به دست آمد (ردی و ستون‌آتان، ۱۹۸۳). در رایزوسفر گندم، ذرت و لوبیای تیمارشده با دیازینون[3] (O،O-دی‌اتیل-O (۲-ایزوپروپیل-۴-متیل-۶-پریمیدینیل)فسفوروتیوات)، ریزجانداران تجزیه‌کننده دیازینون، نسبت به خاک تیمار شده با آفت‌کش که در آن کشت انجام نشده بود، ۱۰۰ برابر بیشتر بود (گاوریلووا و همکاران، ۱۹۸۳). این ریزجانداران، شامل: باکتری‌ها ، قارچ‌ها و اکتینومایست‌ها بودند. درباره گیاه چغندرقند تیمار شده با ۲، ۴-دی‌کلروفنوکسی اسید استیک (سندمن و لوس، ۱۹۸۴) و گندم تیمار شده با علف‌کش مکوپروپ[4] (۲-(۲-متیل-۴-کلروفنوکسی) اسید پروپیونیک) (لاپین و همکاران، ۱۹۸۵) هم نتایج مشابهی به دست آمده است.

افزون بر پژوهش‌های انجام شده درباره‌ی خاک‌های آلوده به آفت‌کش، کارهای زیادی هم روی خاک‌های آلوده به ضایعات خطرناک غیرکشاورزی که بیشتر آن‌ها مشتقات هیدروکربن‌های آروماتیک هستند، انجام شده است. همچنین مشاهده شده است که تجزیه زیستی این ضایعات خطرناک در ناحیه ریشه گیاهان بالا بوده است. برای نمونه هیدرکربن‌های پلی‌آروماتیک، بنزو(a) آنتراسن، کرایسن، بنزو(a)پایرن و دی‌بنزو (a، h) آنتراسن در رایزوسفر هشت گیاه چمنی نسبت به خاک کشت نشده، بیشتر تجزیه شد (آپریل و سیمس، ۱۹۹۰). سوسپانسیون خاک رایزوسفری چهار گونه گیاهی مختلف که در یک مکان دفن حلال‌های فوق رشد کرده بودند، ۱، ۱، ۲-تری‌کلرواتیلن را به صورت فعالی تجزیه زیستی کردند (والتون و اندرسون، ۱۹۹۰). این گیاهان

1. Temik
2. Parathion
3. Diazinon
4. Mecoprop

دارای انواعی از ریشـــه‌های گوناگون مانند فیبری، مســـتقیم، لگومینوس و مایکوریزایی بودند. دیده شده که ریشه اکتومایکورایزایی پتانسیل تجزیه زیستی بی‌فنیل‌های پلی‌کلره را دارند (دانلی و فلچر، ۱۹۹۲). همچنین قارچ رایزوســفری کارامد *تریکودرما هارزیانوم*[1] قادر به تجزیه زیســتی ترکیب‌های ارگانوکلره، پنتاکلرو فنول، اندوســولفان، دی‌کلرو دی فنیل تری کلرواتان بود (کاتایاما و ماتســومورا، ۱۹۹۳). در منابع به تجزیه زیســتی هیدروکربن‌های مونوآروماتیک فرار (بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، و زایلن) توسـط ریزجانداران در رایزوسـفر سـپیدار، صـنوبر شرقی، بید و ... اشاره شده است (هانگ و همکاران، ۲۰۰۱؛ فرانزمن و همکاران، ۲۰۰۲؛ اسپریگز و همکاران، ۲۰۰۳).

۱۵-۵- روش‌های گیاه‌پالایی برای خاک‌های بیابانی آلوده به نفت

این بخش با توصـیف پیامد آلودگی نفت بر جامعه گیاهی آغاز می‌شـود و در ادامه به پوشش گیاهی به عنوان وسـیله‌ای برای مایه‌زنی یا ورود میکروب‌های استفاده کننده از نفت به خاک‌های بیابانی، و همچنین تغـذیـه این خـاک‌هـا بـا مواد شـــیمیـایی بـه ویژه کودهای نیتروژنی که ســـبب تقویت میکروب‌های استفاده کننده از هیدروکربن‌ها می‌شوند، می‌پردازد.

۱۵-۵-۱- برهم‌کنش نفت با گیاهان

آلودگی خاک با نفت خام یا فرآورده‌های آن می‌تواند به نحو چشـــم‌گیری بر رشـــد گیاهان در این خاک‌ها تاثیرگذار باشـد. این پیامدها نسـبتاً پیچیده هسـتند و سـمیت مسـتقیم و تاثیر خطرناک غیرمسـتقیم از راه برهم‌کنش هیدروکربن‌ها با اجزای غیرزیستی و میکروبی خاک را در بر می‌گیرند (بوسـرت و بارتا، ۱۹۸۴). بیشـترین سـمیت مسـتقیم از نقطه جوش پایین هیدروکربن‌هایی ناشـی می‌شـود که سـبب می‌شـود این ترکیب‌ها حل شـده و به غشای یاخته‌ای بخش‌های ظریف ریشه و ساقه گیاه آسیب بزند (مک‌گیل و همکاران، ۱۹۸۱). پیامدهای خطرناک غیرمستقیم، شامل: کمبود اکســـیژن در ناحیه ریشـــه گیاهان اســـت که به واســـطه‌ی رقابت میکروفلور رایزوســـفری به ویژه ریزجانداران اسـتفاده‌کننده از هیدروکربن‌ها بر سـر اکسیژن ایجاد می‌شود (بوسرت و بارتا، ۱۹۸۴). افزون بر این، می‌دانیم که نفت خام به سـاختمان فیزیکی خاک آسـیب می‌زند و بنابراین گنجایش نگـه‌داری آبِ خاک و درجه تهویه آن را کاهش می‌دهد (دی‌یونگ، ۱۹۸۰). نشـــت نفت در مقیاس وسـیع ظاهراً در مقایســه با کاربرد مقادیر متوسـط (۵-۱ درصـد نفت) ضـایعات نفتی، پیامدهای خطرناک بیشتری بر گیاهان دارد (کیناکو، ۱۹۸۱). به عبارت دیگر، سطح زیر یک درصد نفت خام، ممکن اسـت رشد گیاه و تولید آن را افزایش دهد (پال و اُورکش، ۱۹۷۸) که احتمالاً دلیل آن عمل

1. *Trichoderma harzianum*

کردن برخی از اجزای هیدروکربن‌های آروماتیک به عنوان هورمون‌های رشد گیاهی هستند (فتاح و ورت، ۱۹۷۰). ترکیب‌های واسطه مانند الکل‌های چرب، آلدهیدهای چرب، اسیدهای چرب، ترپنوییدها و سایرین، که در فرایند تجزیه میکروبی هیدروکربن‌ها به وجود می‌آیند هم، ممکن است برای گیاه سمیت داشته باشند (استیونسون، ۱۹۶۶).

در منابع گزارش‌هایی مبنی بر اینکه برخی گیاهان نسبت به سایرین در برابر آلودگی نفتی مقاوم‌ترند، وجود دارد (کیناکو، ۱۹۸۱). گیاهان کشت شده در یک خاک زراعی در نیجریه که به نفت (ناشی از چاه نفتی) آلوده شده بود، در فرایند بازیابی، پاسخ‌های متفاوتی داشتند (اُدو، ۱۹۷۲). گیاهان غده‌ای مانند سیب‌زمینی[1] و کاساوا[2] بیش از همه آسیب دیدند در حالی‌که انبه و موز سازگارتر بودند. در نزدیک قطب شمال که خاک با سوخت جت آلوده شده بود، گیاهان علفی و کاج‌ها[3] رشد نکرده بودند (یا از بین رفته بودند)، نهال‌های بید و توسکا[4] تا حدی دوباره رشد کرده بودند و صنوبر و کاج اروپایی[5] بیشتر از همه مستقر شده بودند (هانت و همکاران، ۱۹۷۳). جوانه‌ها، گیاهان یک ساله و آن‌هایی که پوشش سطحی زیاد و ریشه کم عمق دارند، خزه‌ها و گل سنگ‌ها بیشتر از همه به نفت و هیدروکربن‌ها حساس‌اند (مک‌گیل و نایبرگ، ۱۹۷۵؛ مک‌گیل و همکاران، ۱۹۸۱).

۱۵-۵-۲- پوشش گیاهی برای مایه‌زنی

کاربرد فنّاوری گیاه‌پالایی چندین برتری دارد. نسبتاً ساده و اقتصادی است، جلوی فرسایش و انتقال خاک آلوده را می‌گیرد، به هم‌خوردگی و اختلال زیست محیطی ایجاد نمی‌کند و از منظره خوش‌آیندی نیز برخوردار است. بنابراین، گیاه‌پالایی پذیرش عمومی خوبی دارد (کومیوس و گولنر، ۲۰۰۰) و می‌توان به آن از دیدگاه سامانه پاک‌کننده خورشیدی هم نگریست. در بخش‌های بالایی به پتانسیل کاربرد گیاهان به عنوان سمیت‌زدا، فیلتر یا تله در پاک‌سازی خاک‌های آلوده، پرداخته شد. در اینجا بحث به پتانسیل کاربرد میکروفلور رایزوسفری در پاک‌سازی خاک‌های بیابانی آلوده به نفت محدود خواهد شد.

در عمل به دلایلی که در بالا اشاره شد، مایه‌زنی موفقِ سوسپانسیون میکروبی در نواحی بیابانی آلوده آسان نیست. افزون بر این، شواهد آزمایشگاهی وجود دارد که باکتری‌های استفاده کننده از نفت که به طور معمول وارد خاک می‌شوند، برای جاگیری در محیط جدید مشکل دارند و با

1. Yams
2. Cassava
3. Herbs and conifers
4. Willow and dogwood
5. Spruce and larch

شکست روبه رو شده‌اند (رادوان ۱۹۹۰؛ رادوان و همکاران، ۱۹۹۷). بنابراین به نظر می‌رسد پوشش گیاهی روش عملی برای وارد کردن باکتری‌ها به خاک باشد. به ویژه پس از اینکه کشف شده که رایزوسفر بیشتر گیاهان نسبتاً سرشار از میکروفلور استفاده کننده از نفت هستند (جدول ۱۵-۳). اگرچه آلودگی نفتی همراه با تقویت خاک بیابانی با ریزجانداران تجزیه کننده هیدروکربن است (رادوان و همکاران، ۱۹۹۰، ۱۹۹۷)، اما رایزوسفر گیاهان طبیعی ناحیه خلیج فارس ریززیستگاهی است که از میکروفلور تجزیه کننده، نفت سرشارتری برخوردار است (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵b، ۱۹۹۸a). *سنسیو گلاکوز*[1]، *سیپروس سنگلومراتس*[2]، *لائونا موکرُناتا*[3]، *پیکریس بابیلونیکا*[4] و *سالسولا*[5] از جمله این گیاهان بیابانی هستند. همچنین رایزوسفر گیاهان زراعی لگومی مانند لوبیاها و لوپن که در نمونه‌های خاک بیابانی دست نخورده آلوده به نفت کشت شده بودند، رایزوسفر غنی از باکتری‌های استفاده کننده از نفت (نسبت به خاک غیر رایزوسفر) ایجاد کردند (رادوان و همکاران، ۱۹۹۵b). *سلولوموناس فلاویجنا*[6]، *رودوکوکوس اریتروپولیس* و *آرتروباکترها* گونه‌های غالب بودند. دیده شده که رایزوسفر درخت صنوبر در مقایسه با خاک غیر رایزوسفری پنج برابر بیشتر میکروب تجزیه کننده بنزن، تولوئن و زایلن دارد (جوردال و همکاران، ۱۹۹۷).

1. *Senecio glaucus*
2. *Cyperus cenglomeratus*
3. *Launaea mucronata*
4. *Picris babylonica*
5. *Salsola imbricate*
6. *flavigena*

جدول ۱۵-۳ شمار باکتری‌های استفاده کننده از نفت در رایزوسفر گیاهان در خاک‌های بیابانی کویت

گیاه	10^6 × تعداد بر گرم		منبع
	خاک	رایزوسفر	
سایپروس کونگلومراتس[1]	۹۰	۲۰۰	رادوان و همکاران (۱۹۹۸)
لونیا موکروناتا[2]	۹۰	۳۴۰	
پیکریس بابیلونیکا[3]	۹۰	۱۰۸	
ویسیا فابا[4]	۴۰	۹۰۰	
لوپینوس آلبوس[5]	۴۰	۳۱۰۰	
فازئولوس ولگاریس[6]	۱	۱۰	رادوان و همکاران (منتشر نشده)
برمودا گراس[7]	۸	۱۲	
گراس آمریکایی[8]	۱۴	۱۷	

شواهد آزمایشگاهی وجود دارد که نشان می‌دهد نفت نشت شده در خاک دارای پوشش، نسبت به خاک بدون پوشش زودتر ناپدید می‌شود. اگرچه مقادیر کمی از هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک با وزن مولکولی کم در پوسته ریشه هویج دیده شده است، اما به نظر نمی‌رسد ریشه‌ها، هیدروکربن‌ها را به طور مستقیم جذب کنند (ورورک کمپل، ۲۰۰۲). در سوی دیگر، پارامترهایی مانند کربن آلی، pH، حلالیت اجزای معدنی و موارد دیگر هم به گونه‌ی معنی‌داری در رایزوسفر تغییر می‌کنند (ریلی و همکاران، ۱۹۹۶). به طوری‌که تغییر آن‌ها نیز بر میکروفلور پیامد داشته و آن را در مقایسه با خاک غیر رایزوسفری تقویت می‌کنند. کشت باقلا در نمونه‌های خاک شنی، پاک‌سازی شن را از طریق میکروفلور رایزوسفری افزایش داد (رادوان و همکاران، ۲۰۰۰a). این گیاه لگوم قادر به تحمل بیش از ۱۰ درصد نفت خام در خاک است و افزون بر این، رایزوسفر را نیز با نیتروژن تثبیت شده زیستی تقویت می‌کند. دیده شده است که فاکتورهای تقویت کننده رشد و فعالیت گیاه نیز سبب افزایش حذف هیدرکربن‌ها در خاک می‌شوند. بنابراین مایه‌زنی ریشه باقلا با باکتری‌های ریشه‌ای

1. *Cyperus conglomeratus*
2. *Lunea mucronata*
3. *Picris babylonica*
4. *Vicia faba*
5. *Lupinus albus*
6. *Phaseolus vulgaris*
7. Bermuda grass
8. American grass

تقویت کننده رشد گیاه یا باکتری‌های گره‌زا، پتانسیل گیاه‌پالایی این گیاه را در خاک بیابانی آلوده به نفت افزایش داد (رادوان و همکاران، ۲۰۰۵b). جالب است بدانید که ثابت شده است که باکتری‌های گره‌زا مانند *رایزوبیوم*، *برادی‌رایزوبیوم*[1] و ... و باکتری‌های افزاینده رشد مانند *سودوموناس*، *فلاووباکتریوم*، *سراشیا* و ... پتانسیل تجزیه هیدروکربن‌ها را دارند (رادوان و همکاران، ۲۰۰۷b). یافته‌های آزمایشگاهی (منتشر نشده) نشان می‌دهد که پوشش گیاهی چمنی (برمودا گراس و گراس امریکایی)، می‌تواند آلودگی نفتی خاک بیابانی را از راه فنّاوری زیستی رایزوسفر کاهش دهد. باکتری غالب که در رایزوسفر هر دو گیاه یافت شد *آرتروباکتر دکسترانالیتیکوس*[2]، *سودوموناس فلورسنس* و *گوردونیا پلی‌ایزوپرنیورانس*[3] بود.

جدول ۱۵-۴ کاهش غلظت هیدروکربن‌ها با گیاه‌پالایی

گیاه	هیدروکربن	HC مصرف شده (درصد)		منبع
		بدون پوشش گیاهی	همراه با پوشش گیاهی	
ویسیا فابا	نفت خام	۳۰/۹	۵۰/۱-۷۱/۳	رادوان و همکاران (۲۰۰۵)
برمودا گراس	نفت خام	۵۹	۷۴-۸۰	رادوان و همکاران (منتشر نشده)

موارد فوق حاکی از آن است که پوشش گیاهی می‌تواند یک روش امکان‌پذیر برای وارد کردن یا مایه‌زنی مناطق بیابانی نفتی با ریزجانداران تجزیه کننده نفت باشد و غلظت آن را در خاک کاهش دهد (جدول ۱۵-۴). در این زمینه روشن است که کارهای زراعی مرسوم مانند آبیاری، آهک‌دهی، مدیریت فیزیکی و غیره سبب تقویت فعالیت‌های میکروبی می‌شوند.

۱۵-۵-۳- پوشش گیاهی برای کوددهی

پوشش گیاهی نه تنها خاک آلوده به نفت را از ریزجانداران تجزیه کننده‌ی آن غنی می‌کند، بلکه محیط را با موادی که رشد و فعالیت این میکروب‌ها را افزایش می‌دهند، نیز تقویت می‌کند. پیش‌تر اشاره شد که تراوش‌های ریشه‌ای در رایزوسفر شامل قندهای ساده، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و ... است. منابع مواد آلی برای بهبود محیط فقیری مانند خاک بیابان ارزشمند هستند. مواد آلی

1. *Bradyrhizobium*
2. *Dextranalyticus*
3. *Gordonia polyisoprenivorans*

ویژگی‌های فیزیکی شن مانند گنجایش نگه‌داری آب و تبادل کاتیونی را بهبود می‌بخشد. این امر به ویژه به نفع ریزجانداران استفاده کننده از نفت است که در پیرامون ریشه جای گرفته‌اند. افزون بر این از آنجا که بیشتر ریزجانداران استفاده کننده از نفت توان بهره‌گیری از منابع کربن آلی معمول را نیز دارند، این مواد سبب تکثیر فعال آن‌ها در خاک بیابان شده که آن هم سبب افزایش تجزیه نفت می‌شود. نتایج پژوهش‌های رادوان و همکاران (۲۰۰۰b) این فرض را تایید می‌کند. بنابراین کوددهی یا تقویت غذایی نمونه خاک بیابانی آلوده به نفت با مخلوطی از گلوکز و پپتون، تجزیه زیستی هیدروکربن در این خاک را افزایش داد. دامنه این تاثیر آن‌قدر زیاد بود که بتوان آن را به نیتروژن پپتون نسبت داد. کوددهی با نیترات پتاسیم که دارای نیتروژن برابر با پپتون بود سبب تجزیه زیستی نفت اما با شدت بسیار پایین‌تر شد. دیده شده است که کوددهی نمونه‌های خاک بیابانی با گلوکز/پپتون سبب افزایش شمار کلی ریزجانداران استفاده کننده از نفت می‌شود. پس از دو هفته، میکروب‌های بومی خاک، گلوکز و پپتون افزوده شده به آن را مصرف کردند. اما شمار آن‌ها همچنان بالا ماند که ظاهراً این موضوع نشان دهنده آن است که آن‌ها رشد خود را روی هیدروکربن به عنوان سوبسترا ادامه داده‌اند. این یافته‌ها به ما این اجازه را می‌دهد که نتیجه بگیریم تراوش‌های آلی ریشه گیاهان مانند قندهای ساده و آمینو اسیدها به نفع میکروفلور رایزوسفری استفاده کننده از نفت و در پی آن گیاه‌پالایی می‌شوند. چنین چیزی احتمالاً درباره‌ی ویتامین‌های تراوش شده هم درست است. در شرایط آزمایشگاهی دیده شده که ویتامین‌ها نیز سبب تقویت رشد و فعالیت ریزجانداران استفاده کننده از نفت می‌شوند (رادوان و الموطیری، ۲۰۰۱).

همچنین به نظر می‌رسد پوشش گیاهی یک راه‌کار عملی و کارآمد برای تقویت غذایی (کوددهی) محیط بیابانی آلوده به نفت با ترکیب‌های نیتروژنی باشد. در گزارش‌ها به وفور اشاره شده است که کودهای نیتروژنی عامل محدود کننده در تجزیه میکروبی هیدروکربن‌ها هستند (اتلس، ۱۹۸۱؛ لیهی و کالول، ۱۹۹۰؛ رادوان و همکاران، ۱۹۹۵a). شاید این امر توجیهی برای این موضوع باشد که چرا گیاهان لگومی در نمونه‌های خاک بیابانی آلوده به نفت سبب تقویت تجزیه زیستی آن می‌شوند (بنکس و همکاران، ۲۰۰۰؛ رادوان و همکاران، ۲۰۰۱). ریشه‌های گیاهان لگومی دارای گره‌هایی هستند که در آن‌ها نیتروژن مولکولی تثبیت می‌شود و بنابراین یک مسیر اقتصادی و طبیعی برای تغذیه نیتروژن هستند (رادوان، ۲۰۰۸). شگفت‌آور آنکه دیده شده است که باکتری‌های دیازوتروف ساکن در گره توان استفاده از هیدروکربن را نیز دارند (پرانترا و همکاران، ۲۰۰۲؛ رادوان و همکاران، ۲۰۰۷b). در این زمینه دیده شده است که گره‌های ریشه لگوم که بریده شده و در آزمایشگاه در آب آلوده به نفت قرار گرفتند، غلظت هیدروکربن‌ها را کاهش دادند (دشتی و همکاران، ۲۰۰۵؛ ۲۰۰۷b). فاکتورهایی که گره‌زایی در ریشه لگوم‌ها را بهبود می‌بخشند (مانند مایه‌زنی ریشه با باکتری‌های گره) و فعالیت‌ها و رشد گیاهان را افزایش می‌دهند (مانند مایه‌زنی با

باکتری‌های افزاینده رشـــد)، به طور هم‌زمان غلظت نفت در خاک‌های زیر پوشـــش این گیاهان را کاهش خواهند داد. ظاهراً این پیامدها تنها به دلیل تغذیه نیتروژنی نیســت و نشــان می‌دهد که هم بـاکتری‌هـای گره‌زا و هم بـاکتری‌هـای افزاینده رشـــدگیاهان، هر دو تجزیه کننده هیدروکربن نیز هســتند. *سودوموناس‌ها* بخش بزرگی از باکتری‌های گروه دوم را شامل می‌شوند که از مدت‌ها پیش به عنوان تجزیه کنندگان هیدروکربن شـــناخته شـــده هســـتند (کینگ و مارکوتس، ۱۹۷۱؛ لِوی و همکاران، ۱۹۷۹؛ اینسله، ۱۹۸۳).

ممکن اســت باور بر این باشــد که تنها گیاهان لگومی می‌توانند خاک نفتی را با نیتروژن تثبیت شـده مورد نیاز برای گیاه‌پالایی تقویت کنند. یافته‌های منتشـر نشـده در آزمایشگاه ما نشان داد که گیاهان غیرلگومی مانند گیاهان چمنی (برمودا گراس و گراس آمریکایی)، که به عنوان گیاه پوششی کشت داده شده بودند، در رایزوسفر خود فلور باکتریایی سرشاری دارند که هر دو فعالیت استفاده از هیدروکربن و تثبیت غیرهمزیســت نیتروژن را دارا هســتند. جانداران همانندی هم پیدا شـــده که می‌تواننـد در ســـطح پیرامونی گره‌هـا در ریشـــه لگوم‌هـا کلنی تشـــکیل دهند. در جدول ۵-۱۵ باکتری‌هایی ارائه شـــده اســـت که هم‌زمان، هم دیازوتروف و هم تجزیه کننده هیدروکربن هســـتند. ظاهراً این ریزجانداران ابزار ارزشـــمندی در پاک‌ســـازی محیط آلوده به نفت فقیر از نیتروژن مانند خـاک‌هـای بیـابـانی هســـتنـد. مـا دلایلی داریم کـه باور کنیم بیشـــتر باکتری‌های معمول که از هیدروکربن‌ها بهره می‌برند، تثبیت کننده نیتروژن نیز هستند و برعکس.

جدول ۱۵-۵ جنس‌های باکتری‌های رایزوسفری که هردو فعالیت تثبیت نیتروژن و بهره‌گیری از هیدروکربن‌ها را دارند (نتایج منتشر نشده)

بهره‌گیری‌کننده از نفت[a] با توانایی تثبیت نیتروژن	دیازوتروف‌ها[b] با توانایی بهره‌گیری از نفت
باسیلوس	*ردوکوکوس*
اُکروباکتروم[1]	*لیفسونیا*[2]
نوکاردیا	*باسیلوس*
سودوزانتوموناس[3]	*رایزوبیوم*
رودوکوکوس	*بِروی‌باسیلوس*
پانتوا[4]	*سلولوسی‌میکروبیوم*[5]
آرتروباکتر	*استنوتروفوموناس*[6]

جدول ۱۵-۵ (ادامه)

بهره‌گیری‌کننده از نفت[a] با توانایی تثبیت نیتروژن	دیازوتروف‌ها[b] با توانایی بهره‌گیری از نفت
انتروباکتر	*کوکوریا*
میکروکوکوس	*آرتروباکتر*

توجه: همه جدایه‌ها نیتروژناز-مثبت بوده و فراوانی آن‌ها از بالا به پایین کم می‌شود

[a] اولین بار روی محیط معدنی با بخار نفت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی جدا شده‌اند

[b] اولین بار روی محیط بدون نیتروژن جدا شده‌اند

۱۵-۶- نتیجه‌گیری

گیاه‌پالایی به عنوان یک فنّاوری به صرفه و امکان‌پذیر برای مناطق بیابانی آلوده به نفت است. در اینجا هزینه‌ها بیشتر به عملیات کشت وکار معمول محدود می‌شود که اگرچه این هزینه‌ها به دلایل روشن بیشتر از مدیریت خاک کشاورزی معمولی خواهد بود، اما بدون شک کمتر از اتخاذ فنّاوری‌های پاک‌سازی جایگزین مانند حذف میکروبی آلاینده در راکتور زیستی است. افزون بر این، گیاه‌پالایی منظره خوشایندی ایجاد کرده، دوست‌دار محیط زیست بوده و جلوی انتقال خاک آلوده با فرسایش را می‌گیرد. دو مشکل مهمی که در این فنّاوری باید چاره‌اندیشی شود شامل گزینش گیاه بردبار به شرایط بیابانی و نفت و فراهم کردن آب مناسب است. گیاهان زراعی زیادی به ویژه لگوم‌هایی مانند باقلا وجود دارند که به غلظت تا بیش از ۱۰ درصد نفت مقاوم هستند. این گونه

1. *Ochrobacterum*
2. *Leifsonia*
3. *Pseudoxanthomonas*
4. *Pantoea*
5. *Cellulosimicrobium*
6. *Stenotrophomonas*

گیاهان را می‌توان در همه سال در بیابان‌های معتدل و در فصول ملایم در بیابان‌های خشک و نیمه‌خشک داغ کشت کرد. در جایی که غلظت نفت بسیار بالا باشد، خاک را می‌توان پیش از کشت با شن غیرآلوده مخلوط کرد. از سوی دیگر نیز آب بایستی با وسیله مناسب به منطقه حمل شود.

گیاهان در پیرامون خود مجموعه‌ای از ریزجانداران بهره‌گیری‌کننده از نفت، غیر همزیست، و در لگوم‌ها باکتری‌های همزیست دیازوتروف دارند. بیشتر باکتری‌های رایزوسفری هردو فعالیت بهره‌گیری از هیدروکربن و تثبیت نیتروژن را نشان می‌دهند. خاک بیابانی پس از گیاه‌پالایی، احتمالاً به خاک حاصلخیزی تبدیل خواهد شد که این هم یک مزیت دیگر برای این فنّاوری زیستی است.

منابع

Abdel-Nasser M, Makawi AA, Abdel-Moneir AA (1979) Occurrence of certain microorganism in rhizosphere soils of maize, common-bean and cotton as affected by the application of temik or orthocide pesticides. Egypt J Microbiol 14:37–44.

Al-Awadhi H, El-Nemr I, Mahmoud H, Sorkhoh N, Radwan SS (2008) Plant-associated bacteria as tools for phytoremediation of oily nitrogen-poor soils. Int J Phytoremd 11:1–17.

Al-Awadhi H, Sulaiman RHD, Mahmoud HM, Radwan SS (2007) Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. Appl Microbiol Biotechnol 77:183–186.

Alexander M (1994) Biodegradation and bioremediation. Academic, San Diego Al-Hasan RH, Al-Bader DA, Sorkhoh NA, Radwan SS (1998) Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. Mar Biol 130:521–527.

Al-Hasan RH, Sorkhoh NA, Al-Bader D, Radwan SS (1994) Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf. Appl Microbiol Biotechnol 41:615–619.

Anderson TA, Kruger EL, Coats JR (1994) Biodegradation of pesticide wastes in the root zone of soils collected at an agrochemical dealership. In: Anderson TA, Coats JR (eds) Bioremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington DC, pp. 199–209.

Aprill W, Sims RC (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treated in soil. Chemosphere 20:253–265.

Applied Biotreatment Association (1989) Case history compendium. Applied Biotreatment Association, Washington DC.

Applied Biotreatment Association (1990) The role of biotreatment of oil spills. Applied Biotreatment Association, Washington DC.

Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol Rev 45:180–209.

Atlas RM (1995) Bioremediation. Chem Eng News, April 3:32–42.

Atlas RM, Bartha R (1972) Degradation and mineralization of petroleum in seawater. Limitation by nitrogen and phosphorus. Biotech Bioeng 14:309–318.

Atlas RM, Bartha R (1998) Microbial ecology, fundamentals and applications, 4th edn. Benjamin/ Cummings, California.

Atlas RM, Heintz CE (1973) Ultrastructure of two species of oil-degrading marine bacteria. Can J Microbiol 19:43–45.

Atlas RM, Pramer D (1990) Focus on bioremediation. ASM News 56:7

Barabas G, Sorkhoh NA, Fardoon F, Radwan SS (1995) n-alkane utilization by oligocarbophilic actinomycete strains from oil-polluted Kuwaiti desert soil. Actinomycetol 9:13–18.

Banks MK, Govindaraju RS, Schwab AP, Kulakow P (2000) Part I: Field demonstration. In: Fiorenza S, Oubre CL, Ward CH (eds) Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil. Lewis Publishers, Baton Rouge, pp 3–88.

Bossert I, Bartha R (1984) The fate of petroleum in soil ecosystem. In: Atlas RM (ed) Petroleum microbiology. Macmillan, New York, pp 435–473.

Boulton CA, Ratledge C (1984) The physiology of hydrocarbon-utilization microorganisms. In: Wiseman A (ed) Topics in fermentation and enzyme technology, vol 9. Ellis Horwood, Chichester, pp 11–77.

Boyle J, Shann J (1995) Biodegradation of phenol, 2,4-DCP and 2,4,5-T in field-collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. J Environ Qual 24:782–785.

Curl EA, Truelove B (1986) The rhizosphere. Springer, Berlin.

Cerniglia CE, Gibson DT, van Baalen C (1980a) Oxidation of naphthalene by the cyanobacteria and microalgae. J Gen Microbiol 116:495–500.

Cerniglia CE, van Baalen C, Gibson DT (1980b) Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium Oscillatoria sp. strain JCM. J Gen Microbiol 116:485–494.

Cundell AM, Mueller WC, Traxier RW (1976) Morphology and ultrastructure of a Penicillium sp. grown on n-hexadecane or peptone. Appl Environ Microbiol 31:408–414.

Dashti N, Khanafer M, Radwan SS (2005) Endophytic and epiphytic hydrocarbon-utilizing bacteria associated with root nodules of legumes. In: Proceedings, Twenty-eighth Arctic and Marine Oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar, Calgary.

Dejong E (1980) The effects of a crude oil spill on cereals. Environ Pollut Ser 22:187–196.

Donnelly PK, Fletcher JS (1992) Abstracts of the 13th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Cincinnati, OH, USA, p 103.

Drees KP, Neilson JW, Betancourt JL, Quade J, Henderson DA, Pryor BM, Maier RM (2006) Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. Appl Environ Microbiol 72:7902–7908.

Einsele A (1983) Biomass from higher n-alkanes. In: Rehm H-J, Reed G (eds) Biotechnology — a comprehensive treatise, vol 3. Verlag Chemie, Weinheim, pp 43–81.

Ellis BE (1977) Degradation of phenolic compounds by freshwater algae. Plant Sci Lett 8:213–216.

Franzman PD, Robertson WJ, Zappia LR, Davis GB (2002) The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. Biodegradation 13:65–78.

Fattah AH, Wort DJ (1970) Effect of light and temperature on stimulation of vegetative and reproductive growth of bean plants by naphthenates. Agron J 62:576–577.

Friedmann EL (1992) Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert. Science 215:1045–1053.

Fukui A, Tanaka A (1981) Metabolism of alkanes by yeasts. Adv Biochem Eng 19:217–237.

Gavrilova EA, Kruglov YV, Garankina NG Tr. Vses (1983) Influence of plants and rhizosphere microflora on degradation of diazinon in soil. Nauchno Issled Instit Skh Mikrobiologii 52:67–70.

Gibbs CF (1975) Quantitative studies on marine biodegradation of oil. I. Nutrient limitation at 14°C. Proc R Soc London 188:61–82.

Gibbs CF, Pugh KB, Andrews AP (1975) Quantitative studies on marine biodegradation of oil. II. Effect of temperature. Proc R Soc London 188:83–94.

Glavin DP, Cleaves HJ, Schubert M, Aubrey A, Bada JL (2004) New methods for estimating bacterial cells abundances in natural samples by use of sublimation. Appl Environ Microbiol 70:5923–5928.

Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotech Adv 21:383–393.

Gomez-Silva B, Rainey FA, Warren-Rhodes KA, McKay CP, Navarro-Gonzalez R (2008) Atacama desert soil microbiology. In: Dion P,

Nautiyal CS (ed) Microbiology of extreme soils, vol 13. Springer, Heidelberg, pp 117–132.

Hasnain S, Yasmin S, Yasmin A (1993) The effect of lead resistant Pseudomonads on the growth of Triticum aestivum seedlings under lead stress. Environ Pollut 81:179–184.

Hinchee RE, Olfenbuttel RE (1991a) In situ bioreclamation: applications and investigations for hydrocarbon contaminated site remediation. Butterworth-Heinemann, Boston.

Hinchee RE, Olfenbuttel RE (1991b) On site bioreclamation: processes for xenobiotic and hydrocarbon treatment. Butterworth-Heinemann, Boston.

Hong MS, Farmayan WF, Dortch IJ, Chiang CY (2001) Phytoremediation of MTBE from a ground water plume. Environ Sci Technol 35:1231–1239.

Hunt PG, Rickard WE, Deneke FJ, Koutz FR, Murman RP (1973) Terrestrial oil spills in Alaska: environmental effects and recovery. In: API/EPA-USCG, Prevention and control of oil spills. American Petroleum Institute, Washington DC, pp. 733–740.

Ivshina IB, Nesterenko OA, Glazacheva LE, Shekhotsev VP (1982) Facultative gas assimilating Rhodococcus rhodochrous studied by electron microscope. Mikrobiologiya 51:477–481.

Jordahl JL, Foster L, Schnoor JL, Alvarez PJJ (1997) Effect of hybrid poplar tree on microbial population important to hazardous waste bioremediation. Environ Toxicol Chem 16:1318–1321.

Katayama A, Matsumura F (1993) Degradation of organochloride pesticides, particularly endosulran, by trichloro harzianum. Environ Toxicol Chem 12:1059–1065.

Kennedy RS, Finnerty WR (1975) Microbial assimilation of hydrocarbons. 1. The fine structure of hydrocarbon-oxidizing Acinetobacter sp. Arch Microbiol 10:75–83.

Kinako PDS (1981) Short-term effect of oil pollution on species numbers and productivity of a simple terrestrial ecosystem. Environ Pollut Ser 26:87–91.

Klug MJ, Markovetz AJ (1971) Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. Adv Microb Physiol 5:1–43.

Knaebel DB, Vestal JR (1994) Intact rhizosphere microbial communities used to study microbial biodegradation in agricultural and natural soils. In: Anderson TA, Coats JR (eds) Bioremediation through

rhizosphere technology. American Chemical Society, Washington DC, pp 56–69.

Komives T, Gullner G (2000) Phytoremediation. In: Wilkinson RE (ed) Plant-environment interaction. Marcel Dekker, New York, pp 437–452.

Koval EZ, Redchitz TI (1978) Fatty inclusions in the mycelium of aspergilli grown under surface cultivation on media with hydrocarbons. Mikrobiol Zh 40:736–740.

Lappin HM, Greaves MP, Slater JH (1985) Degradation of the herbicide mecoprop [2-(2-methyl-4 chlorophenoxy) propionic acid] by a synergistic microbial community. Appl Environ Microbiol 49:429–433.

Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbiological degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev 54:305–315.

Lester ED, Satomi M, Ponce A (2007) Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. Soil Biol Biochem 39:704–708.

Levi ID, Shennan JL, Ebbon GP (1979) Biomass from liquid n-alkanes. In: Rose AH (ed) Microbial biomass. Academic, New York, pp 361–491.

Maier LM, Drees KP, Neilson JW, Handerson DA, Quade J, Betancourt JL (2004) Microbial life in the Atacama Desert. Science 306:1289

McGill WB, Nyborg M (1975) Reclamation of wet forest soils subjected to oil spills, Publication No. 6-75-1, Alberta Institute of Pedology. University of Alberta, Edmonton.

McGill WB, Rowell MJ, Westlake DWS (1981) Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components. In: Paul EA, Ladd JN (eds) Soil biochemistry, vol 5. Marcel Dekker, New York, pp 229–296.

Mueller JG, Chapman PJ, Pritchard PH (1989) Creosote-contaminated sites: their potential for bioremediation. Environ Sci Technol 23:1197–1201.

Navarro-Gonzalez R, Rainey FA, Molina P, Bagaley DR, Hollen BJ, De la Rosa J, Small AM, Quinn RC, Grunthaner FJ, Caceres L, Gomez-Silva B, McKay CP (2003) Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. Science 302:1018–1021.

Odu CTI (1972) Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. In: Extent of contamination and some soil and microbial properties after contamination. J Inst Petrol 58:201–208.

Pal D, Overcash MR (1978) Plant-soil assimilative capacity for oils. In: Proceedings of the 85th National Meeting of the American Institute of Chemical Engineers, Philadelphia.

Paul EA, Clark FE (1996) Soil microbiology and biochemistry, Academic, New York.

Pfender WF (1996) Bioremediation bacteria to protect plants in pentachlorophenol-contaminated soil. J Environ Qual 25:1256–1260.

Polonenko DR, Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA, Laliberte M, Zaleska I (1987) Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by Bradyrhizobium japonicum. Can J Microbiol 33:498–503.

Prantera MT, Drozdowicz A, Gomes-Leite S, Soares-Rosado A (2002) Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N2-fixing soil bacteria. Biotechnol Lett 24:85–89 Radwan SS (1990) Gulf oil spill. Nature 350:456.

Radwan SS (2008) Microbiology of oil-contaminated desert soils and coastal areas in the Arabian Gulf region. In: Dion P, Chandra SN (eds) Microbiology of extreme soils. Soil biology Series 13. Springer, Berlin, pp 275–298.

Radwan SS, Al-Awadhi H, Sorkhoh NA, El-Nemr IM (2000a) Cropping as a phytoremediation practice for oily desert soil with reference to crop safety as food. Int J Phytoremed 2:383–396.

Radwan SS, Al-Awadhi H, Sorkhoh NA, El-Nemr I (1998a) Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for oily Kuwaiti desert. Microbiol Res 153:247–251.

Radwan SS, Al-Mailem D, El-Nemr I, Salamah S (2000b) Enhanced remediation of hydrocarboncontaminated desert soil fertilized with organic carbons. Int Biodet Biodeg 46:129–132.

Radwan SS, Al-Muteirie AS (2001) Vitamin requirements of hydrocarbon-utilizing soil bacteria. Microbiol Res 155:301–307.

Radwan SS, Dashti N, El-Nemr IM (2005b) Enhancing the growth of Vicia faba plants by microbial inoculation to improve their phytoremediation potential for oily desert areas. Int J Phytoremed 7:19–32.

Radwan SS, Dashti N, El-Nemr IM, Khanafer M (2007b) Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria. Int J Phytoremed 9:1–11.

Radwan SS, Barabas G, Sorkhoh NA, Damjanovic S, Szabo I, Szollo”si J, Matko J, Penyige A, Hirano T, Szallo M (1998b) Hydrocarbon uptake by Streptomyces. FEMS Microbiol Lett 169:87–94.

Radwan SS, Sorkhoh NA (1993) Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potential. Adv Appl Microbiol 39:29–90.

Radwan SS, Sorkhoh NA, Al-Hasan RH (1995a) Self-cleaning and bioremediation potential of the Arabian Gulf. In: Cheremisinoff P (ed) Encyclopedia of Environmental Control Technology, vol 9. Gulf Publishing, Houston, pp 901–924.

Radwan SS, Sorkhoh NA, El-Nemr I (1995b) Oil-biodegradation around roots. Nature 376:302.

Radwan SS, Sorkhoh NA, El-Nemr I, El-Desouky AF (1997) A feasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kuwaiti desert. J Appl Microbiol 83:353–358.

Radwan SS, Sorkhoh NA, Fardoun F, Al-Hasan RH (1995c) Soil managements enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. Appl Microbiol Biotechnol 44:265–270.

Redchitz TI (1980) Fatty incorporations in Aspergilllus mycelium during submerged cultivation in media with hydrocarbons. Microbiol Zh 42:596–600.

Redchitz TI, Koval EZ (1979) Formation of volutin inclusions in the mycelium of aspergilli growing on media with hydrocarbons. Mikrobiol Zh 41:34–39.

Reddy BR, Sethunathan N (1983) Mineralization of parathion in rice rhizosphere. Appl Environ Microbiol 45:826–829.

Rehm H-J, Reiff I (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. Adv Biochem Eng 19:175–216.

Reilley KA, Banks MK, Schab AP (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. J Environ Qual 25: 212–219.

Rosenberg E (1993) Microorganisms to combat pollution. Kluwer, Dordrecht.

Rosenberg E (2006) Hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The

prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3rd edn, vol 2. Springer, Berlin, pp 564–577.

Sandmann ERIC, Loos MA (1984) Enumeration of 2,4-D degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media, high populations with sugar cane (Saccharum officinarum). Chemosphere 13:1073–1084.

Sato K (1994) Effect of nutrients on interaction between pesticide pentachlorophenol and microorganisms in soil. In: Anderson TA, Coats JR (eds) Bioremediation through rhizosphere technology. American Chemical Society, Washington, DC, pp 43–55.

Schlesinger WH, Pippin J, Wallenstein M, Hofmockel K, Klepeis D, Hahall B (2003) Community composition and photosynthesis by photoautotrophs under quartz pebbles, southern Mojave Desert. Ecology 84:3222–3231.

Scott GL, Finnerty WR (1966) Characterization of intracytoplasmic hydrocarbon inclusions from the hydrocarbon-oxidizing Acinetobacter species. J Bacteriol 127:481–489.

Seibert K, Fuehr F, Cheng HH (1981) Experiments on the degradation of atrazine in the maize rhizosphere. In: Proceedings of the Theory and Practical Use of Soil Applied Herbicides Symposium. European Weed Resource Society, Paris, France, pp 137–146.

Shann JR, Boyle JJ (1994) Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation. In: Anderson TA, Coats JR (eds) Bioremediation through rhizosphere technology. American Chemical Society, Washington, DC, pp 70–81.

Song HG, Wang X, Bartha R (1990) Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. Appl Environ Microbiol 56:652–656.

Sorkhoh NA, Al-Hasan RH, Khanafer M, Radwan SS (1995) Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. J Appl Bacteriol 78:194–199.

Sorkhoh NA, Ghannoum MA, Ibrahim AS, Stretton RJ, Radwan SS (1990) Crude oiland hydrocarbon degrading strains of Rhodococcus rhodochrous isolated from soil and marine environments in Kuwait. Environ Pollut 65:1–17.

Sorkhoh NA, Ibrahim AS, Ghannoum MA, Radwan SS (1993) High-temperature hydrocarbon degradation by Bacillus stearothermophilus from oil-polluted Kuwait desert. Appl Microbiol Biotechnol 39:123–126.

Spriggs T, Tangaris S, Nzengung VA, Nwokike B (2003) Phytoremediation of chlorinated solvent plume in Orlando, Florida. In: Seventh International in situ and on-site bioremediation symposium. Battelle Press, Columbus OH.

Stevenson FJ (1966) Lipids in soils. J Am Oil Chem Soc 43:203–210.

Stoner DL (1994) Biotechnology for the treatment of hazardous waste. Lewis, Boca Raton Van Hamme JD, Singh A, Ward O (2003) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Molec Biol Rev 67:503–549.

Vevrek MC, Campbell WJ (2002) Identification of plant traits that enhance biodegradation of oil, 9th Annual International Petroleum Environmental Conference, Oct. 22–25, Albuquerque.

Walton BT, Anderson TA (1990) Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. Appl Environ Microbiol 56:1012–1016.

Warren-Rhodes KA, Rhodes KL, Pointing SB, Ewing S, Lacap DC, Gomez-Silva B, Amundson R, Friedmann EI, McKay CP (2006) Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. Microb Ecol 52:389–398.

Widdel F, Boetius A, Rabus R (2006) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3rd edn., vol 2. Springer, Berlin, pp 1028–1049.

Wierzchos J, Ascaso C, McKay CP (2006) Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. Astrobiology 4:415–422.

Zarilla KA, Perry JJ (1984) Thermoleophilum album gen. nov. and sp. nov., a bacterium obligate for thermophily and n-alkane substrates. Arch Microbiol 137:286–290.

Zhang F, Dashti N, Hynes R, Smith DL (1996) Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean (Glycine max L. Merr) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal zone temperature. Ann Bot 77: 453–459.

Zhang F, Dashti N, Hynes R, Smith DL (1997) Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean (Glycine max L. Merr) growth and physiology at suboptimal root zone temperature. Ann Bot 79: 243–249.

فصل شانزدهم

گیاه‌پالایی فلزهای سنگین: شاخص‌های میکروبی سلامت خاک برای ارزیابی کارایی پالایش

Lur Epelde, José Ma Becerril, Itziar Alkorta, and Carlos Garbisu

۱۶-۱- شاخص‌های میکروبی سلامت خاک

در چند سال گذشته علاقه رو به رشدی به تعریف و ارزیابی سلامت خاک به وجود آمده است که محرک آن تا حدی افزایش آگاهی درباره اینکه خاک جزء مهمی از زیست‌کره است و نه تنها در تولید غذا و فیبر نقش دارد بلکه در حفظ و نگه‌داری کیفیت محیط زیست در مقیاس محلی، منطقه‌ای و جهانی هم مهم است (دوران و پارکین، ۱۹۹۴؛ آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۳a). در بیشتر منابع کیفیت/سلامت خاک به این صورت تعریف شده است: «ظرفیت پیوسته نوع ویژه‌ای از خاک که به عنوان یک سامانه زنده ضروری در یک زیست‌بوم طبیعی یا مدیریت شده عمل کند به طوری که در آن قابلیت تولید گیاهان و حیوانات حفظ شود، کیفیت آب و هوا حفظ شده و بهبود یافته و از زیستگاه و سلامت انسان حمایت شود». البته این تعریف کمی گیج کننده بوده و جای بحث دارد (دوران و پارکین، ۱۹۹۶؛ دوران و سافلی، ۱۹۹۷).

واژه‌های «کیفیت خاک» و «سلامت خاک» معمولاً به جای هم به کار می‌روند. اما اولی بیشتر روی گنجایش خاک به برآورده کردن نیازهای تعریف شده‌ی انسان مانند رشد و پرورش گیاهان خاص می‌پردازد و دومی به گنجایش پیوسته خاک در جهت حفظ و نگه‌داری رشد گیاه و عملکرد آن (کولمن و همکاران، ۱۹۹۸) و همین‌طور به ویژگی‌های بوم‌شناختی خاک به ویژه آن‌هایی که مرتبط با جامعه زیستی خاک هستند مانند تنوع زیستی، ساختار شبکه غذایی، فعالیت، دامنه عملکرد و غیره می‌پردازد (پانکهورست و همکاران، ۱۹۹۷). افزون بر این، عبارت «سلامت خاک» دربردارنده‌ی مفهوم خاک به عنوان سامانه زنده نیز است که مفهومی با بالاترین درجه اهمیت است. زیرا خاک دارای مجموعه‌ی گسترده‌ای از موجودات است که مسئول بیشتر کارهای حیاتی و ضروری آن مانند تجزیه و بازچرخ عناصرغذایی از بافت‌های مرده گیاهی و جانوری، تثبیت نیتروژن، نگه‌داری ساختمان خاک، سمیت‌زدایی از آلاینده‌ها و غیره هستند (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۳b).

متاسفانه، اکنون خاک‌ها با فرایندهایی مانند شور شدن، فرسایش، سله‌بستن[1]، آلودگی، از دست رفتن ماده آلی و تنوع زیستی که سبب از دست رفتن ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن‌ها در سراسر جهان شده است، در حال تخریب هستند. در واقع کیفیت و کمیت عملکرد و خدمات زیست‌بوم خاک با نرخ هشدار دهنده‌ای در حال کاهش است که سبب شده تخریب خاک به عنوان یک مسئله زیست محیطی نیاز به توجه و پاسخ فوری داشته باشد. در این راستا تاریخ به طور مکرر نشان داده که مدیریت نادرست منابع اصلی خاک می‌تواند سبب فقر، تغذیه نامناسب و فاجعه اقتصادی شود (بزدیسِک و همکاران، ۱۹۹۶). در درون یک جامعه ارتباط نیرومندی بین کیفیت/سلامت خاک، کیفیت و کمیت غذا و سلامت، رفاه و آسایش شهروندان می‌توان یافت

1. Sealing

(جانکه و پاپندیک، ۱۹۹۴). در واقع کیفیت زندگی روی زمین ارتباط ناگسستنی با سلامت خاک دارد. به ویژه رهاسازی آلاینده‌ها به خاک در اثر فعالیت‌های انسانی در چند دهه‌ی گذشته بیش از اندازه زیاد شده و از توان خودپاک‌سازی زیست‌بوم خاک فراتر رفته و در نتیجه سبب انباشت مواد سمی خطرناک شده است. بر این اساس، هم‌اکنون آلودگی خاک توجهات عمومی چشم‌گیری را به خود جلب کرده است. زیرا بُعد مسئله نیاز به اقدام فوری دارد (گاربیسو و آلکورتا، ۲۰۰۳).

در این زمینه لازم است که شاخص‌های قابل اعتمادی برای ارزیابی و پایش سلامت خاک وجود داشته باشد. تا امروز تاکید بیشتر روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به عنوان شاخص‌های سلامت خاک بود. اما فراسنجه‌های زیستی، هم به دلیل حساسیت بیشتر به تغییرات در خاک و هم به دلیل گنجایش آن‌ها به دربرداشتن اطلاعاتی که بیشترِ فاکتورهای زیست‌محیطی را در هم می‌آمیزد، سبب شده که از این موارد هم به صورت روزافزونی در ارزیابی و پایش سلامت خاک استفاده شود (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۳b؛ هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a؛ میانگوس و همکاران، ۲۰۰۶). بیشتر فراسنجه‌های زیستی مانند زیست توده میکروبی، تنفس پایه و برانگیخته با سوبسترا، نیتروژن معدنی شونده، فعالیت‌های آنزیمی خاک، فراوانی میکروفلور و فونای خاک، پاتوژن‌های ریشه، تنوع زیستی ساختاری و عملکردی، ساختار زنجیره غذایی، رشد و تنوع گیاهان و ... به عنوان شاخص‌های زیستی سلامت خاک پیشنهاد شده‌اند (پانکهورست و همکاران، ۱۹۹۷). فراسنجه‌های میکروبی به ویژه آن‌هایی که به اندازه، فعالیت و تنوع زیستی جامعه میکروبی خاک وابسته هستند، بیشتر به عنوان شاخص سلامت خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرانجام اینکه فرایندهایی که توسط میکروب‌ها انجام می‌شوند در متنِ کارهای صورت گرفته توسط خاک قرار داشته و ریزجانداران نیز مسئول ۷۰ تا ۸۵ درصد از فعالیت‌های زیستی خاک هستند (ریچله، ۱۹۷۷).

ازآنجا که پدوسفر، هیدروسفر، اتمسفر و بیوسفر باهم، هم‌پوشانی داشته و دراجزای زیست محیطی زیست‌بوم ارتباط تنگاتنگی دارند، هر رخدادی که در خاک روی دهد، پیامد برجسته‌ای نه تنها بر سلامت خاک بلکه بر سلامت زیست‌بوم دارد (هوانگ و همکاران، ۱۹۹۸). مفهوم سلامت زیست‌بوم به عنوان اندازه‌گیری جامع، چند بُعدی، پویا و سلسله مراتبی اجزای زیر تعریف می‌شود: ۱) توان سامانه، که به صورت قابلیت تولید یا توان انجام کار، مواد و انرژی در سامانه به صورت کمی تعریف شود، ۲) انعطاف‌پذیری سامانه، که به صورت توان سامانه به حفظ ساختارش و چگونگی رفتار آن در شرایط تنش تعریف می‌شود و ۳) سازماندهی سامانه، که به صورت تنوع اجزا و درجه وابستگی حیاتی آن‌ها به هم بیان می‌شود (ماگیو و همکاران، ۱۹۹۵؛ کوستانزا و همکاران، ۱۹۹۸؛ راپرت، ۱۹۹۸، آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴a). افزون بر این، یک زیست‌بوم سالم باید ویژگی‌های زیر

را داشته باشد: ۱) باید عاری از «نشانگان آشفتگی زیست‌بوم»[1] باشد. علائم وجود این نشانگان شامل آب شویی عناصر غذایی، کم شدن تنوع گونه‌ها، تغییر در ترکیب گونه‌ها به سمت گونه‌های فرصت طلب، کم شدن قابلیت تولید، بالا رفتن بار بیماری و آفت بوده و به منزله‌ی تخریب زیست‌بوم است، ۲) باید خودنگه‌دار[2] باشد و ۳) نباید پیامد بسیار بد یا تخریب کننده روی سامانه‌های پیرامون داشته باشد (کوستانزا و همکاران، ۱۹۹۲؛ هیلدن و راپورت، ۱۹۹۳؛ راپورت و همکاران، ۱۹۹۷؛ آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴a). اگرچه سلامت خاک را نباید با سلامت زیست‌بوم یکی دانست، اما استفاده از روش سلامت زیست‌بوم برای مطالعه حالت و شرایط خاک می‌تواند اطلاعات مفیدی را مانند بررسی پیامد آلودگی روی عملکرد خاک و کارایی یک فرایند خاص پالایشی روی آن را فراهم کند. همان‌گونه که در بالا اشاره شد توان سامانه را می‌توان با قابلیت تولید یا خروجی مواد و انرژی در سامانه اندازه‌گیری کرد. در خاک می‌توان این فرایندها را با روش‌هایی که روی ویژگی فیزیولوژیکی گسترده تمرکز می‌کنند مانند تنفس خاک و معدنی شدن نیتروژن و یا واکنش‌های خاص آنزیمی که توسط ریزجانداران خاک انجام می‌شوند، بررسی کرد (کندلر، ۲۰۰۷). تنفس خاک به بهره‌وری زیست‌بوم، حاصلخیزی خاک و چرخه کربن در مقیاس جهانی و منطقه‌ای مرتبط است (لیو و ژو، ۲۰۰۶). فعالیت‌های آنزیمی خاک که سرعت چرخه عناصر در خاک را کنترل می‌کنند به ویژه آن‌هایی که دامنه وسیعی از فرایندهای زیستی در خاک را کاتالیز می‌کنند مانند دهیدروژناز، اوره‌آز، فسفاتاز و ...، ارزیابی زیستی یکپارچه و بی‌همتایی از عملکرد خاک ارائه می‌دهند (نانی‌پیری و همکاران، ۲۰۰۲).

انعطاف‌پذیری در مفهوم ثبات (پایداری) گنجانده شده است که هم شامل انعطاف‌پذیری به مفهوم ویژگی‌ای از سامانه برای بازیابی خود پس از اختلال و هم گنجایش ذاتی سامانه برای ایستادگی در برابر اختلال است. این مفهوم را می‌توان در مطالعاتی که درباره‌ی پیامد آلودگی بر سلامت خاک هستند، به کار بست. جالب است که از دیدگاه ثباتِ فرآیندهای بوم‌شناختی، دو نظریه متفاوت وجود دارد: ۱) طبق نظریه اول سامانه‌های بدون تنش پایدارتر هستند. زیرا آن‌ها در شرایط بدون تنش همه منابع را برای حفظ عملکرد خودشان به کار می‌گیرند (لورائو، ۲۰۰۰) و ۲) نظریه دوم پیش‌بینی می‌کند که سامانه تنش دیده پایدارتر است. زیرا در اولین تنش سامانه توان روبه رویی با تنش را پیدا می‌کند و عملکرد خود را حفظ می‌کند (اودوم، ۱۹۸۱).

سرانجام، سازماندهی به پیچیدگی زیست‌بوم برمی‌گردد و تحت تاثیر تنوع گونه‌ها و تعداد مسیرهای تبادل مواد بین هر جزء است (کوستانزا و همکاران، ۱۹۹۸). از منظر بوم‌شناختی در زیست‌بوم خاک، تنوع عملکردی که دربرابر تنوع ساختاری است، اطلاعات مرتبط بیشتری فراهم

1. Ecosystem distress syndrome
2. Self-sustaining

می‌کند (تورثویک و اُوراس، ۲۰۰۷). روش‌های متفاوتی برای تعیین تنوع عملکردی جامعه میکروبی خاک مانند نیم‌رخ‌های فیزیولوژیک در سطح جامعه[1] (پرستون-مَفهم و همکاران، ۲۰۰۲)، فعالیت آنزیمی خاک (لارسون و همکاران، ۲۰۰۲) و انواعی از روش‌های مولکولی مستقل از کشت (مالیک و همکاران، ۲۰۰۸) وجود دارد.

در این فصل امکان استفاده از شاخص‌های میکروبی سلامت خاک برای ارزیابی کارایی فرایند گیاه‌پالایی فلزها بحث شده است.

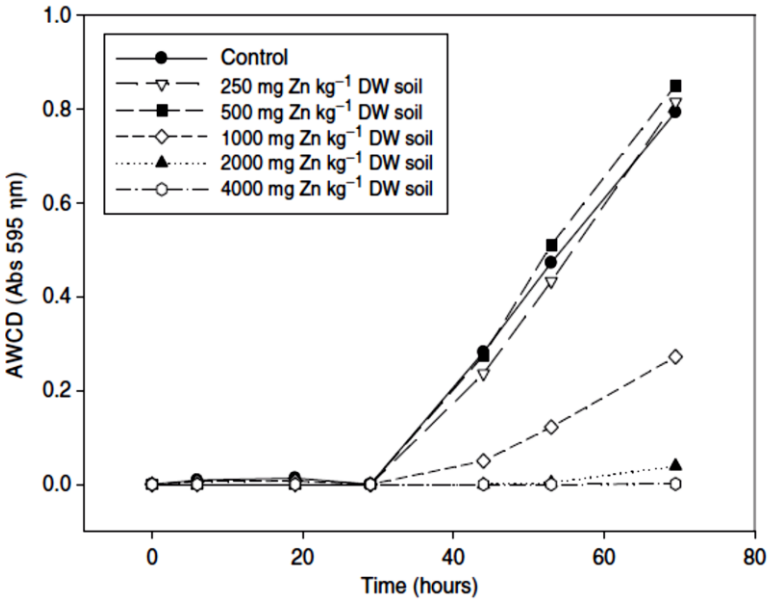
۱۶-۲- گیاه‌پالایی فلزهای سنگین

فلزهای سنگین به عنوان اجزای طبیعی یا به عنوان پیامد فعالیت انسانی در خاک دیده می‌شوند. منابع اصلی آلودگی فلزها شامل سوخت‌های فسیلی، بهره‌برداری از معادن و ذوب سنگ معدن، آب‌کاری، شست‌وشو یا ریزش از خطوط انتقال برق، زباله‌های شهری، کودها، آفت‌کش‌ها و فاضلاب هستند (گاربیسو و آلکورتا، ۲۰۰۱؛ آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴b). در واقع امروزه آلودگی فلزها به یکی از جدی‌ترین مسائل زیست محیطی تبدیل شده است (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴b). برای نمونه، آرسنیک که یک شبه‌فلز غیر ضروری است یک آلاینده زیست‌محیطی نگران‌کننده اصلی بوده که سبب سمیت همه‌گیر در سطح جهانی شده و ده‌ها هزار نفر زخم‌های پوستی، سرطان و سایر علائم مربوط به سمیت آن را دارند (پیرس، ۲۰۰۳؛ آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴c؛ رزاس و همکاران، ۲۰۰۶).

برخی فلزها برای حیات ضروری هستند (مانند آن‌هایی که کوفاکتور ضروری برای متالوپروتئین و آنزیم‌ها هستند). اما در غلظت‌های بالا، فلزها هم برای موجودات عالی و هم برای ریزجانداران سمی هستند (گاربیسو و آلکورتا، ۱۹۹۷). در واقع در غلظت‌های بالا فلزها می‌توانند با بستن گروه‌های عاملی ضروری، جایگزین شدن به جای دیگر یون‌های فلزی یا تغییر آرایش فعال مولکول‌های زیستی، خطرناک شوند (کولین و استوتزکی، ۱۹۸۹). در کنار این‌ها فلزها به دلیل ماهیت تغییرناپذیر آن‌ها (فلزها از این نظر ویژه هستند که تجزیه زیستی و شیمیایی نمی‌شوند که سمیت‌شان کم شود اما حالت اکسیداسیون یا کمپلکس آلی آن‌ها تغییر می‌کند) (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۶) و حضور در خاک (با زمان ماندگاری هزاران ساله) (مک‌گراث ۱۹۸۷)، آلاینده‌هایی با بیشترین نگرانی هستند (گاربیسو و آلکورتا، ۱۹۹۷، ۲۰۰۳). در خاک فاکتور مهمی که سمیت فلز را تعیین می‌کند، دسترسی زیستی آن است نه غلظت کل فلز (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۶a).

1. Community level physiological profiles

در شـــکل ۱۶-۱ نمونه‌ای از پیامد آلودگی فلزها روی جامعه میکروبی خاک (به ویژه بخش قابل کشـــت جامعه هتروتروف آن) آمده اســـت. در این شـــکل منحنی میانگین توســـعه رنگ خوب[1] (AWCD) به دســت آمده از مصـرف سـوبسترای کربن‌دار (یعنی نیم‌رخ‌های فیزیولوژیک در سطح جامعه- CLPP) روی Biolog EcoPlates نشان داده شده است. داده‌ها مربوط به خاک‌هایی است کـه به طور مصـــنوعی با ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم روی، در هر کیلوگرم خاک خشک به صورت $ZnCl_2$ آلوده شده‌اند. نمودار نشان می‌دهد که ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم روی، در هر کیلوگرم خاک خشـک پیامد منفی بر تنوع عملکردی میکروب‌های خاک نداشته است. اما ۱۰۰۰، و بـه ویژه ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم خاک خشـــک بر بخش هتروتروف جامعه میکروبی خاک که از کربن استفاده می‌کنند پیامد روشن داشته است.



شـــکل ۱۶-۱ پیامد آلودگی روی بر نمودار میانگین توســـعه رنگ مناســـب (AWCD) به دســـت آمده روی Biolog EcoPlates. خاک‌ها با ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک خشـــک با $ZnCl_2$ آلوده شده‌اند.

1. Average well colour development

روش‌های فیزیکوشیمیایی مرسوم برای پالایش خاک‌های آلوده به فلزها به طور کلی بسیار گران هستند و همین امر سبب توسعه فنّاوری‌های زیستی نوآورانه برای پالایش اقتصادی این خاک‌ها شد (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a). زیست‌پالایی «یک فرایند مدیریت شده است که از ریزجانداران برای تجزیه و تبدیل مواد شیمیایی در خاک آلوده، آب‌خوان، لجن‌ها و بقایا استفاده می‌کند» (داساپا و لوئهر، ۱۹۹۱) و یک روش پاک‌سازی کارآمد، غیرتخریبی و اقتصادی برای پالایش مکان‌های آلوده فراهم می‌آورد که باید به عنوان یک ابزار مهم در راستای کاهش آلودگی زیست محیطی در نظر گرفته شود (گاربیسو و آلکورتا، ۱۹۹۷، ۱۹۹۹، ۲۰۰۳). با وجود اینکه بیشتر پژوهش‌ها روی بررسی امکان استفاده از ریزجانداران در پالایش محیط‌های آلوده به فلزها بوده است، اما ریزجانداران نتوانسته‌اند مساله اصلی یعنی حذف فلزها از خاک آلوده را حل کنند. در واقع باکتری‌ها تنها می‌توانند فلزها را از یک حالت اکسایشی یا کمپلکس آلی به نوع دیگر تغییر دهند اما نمی‌توانند آن‌ها را از خاک آلوده خارج کنند (گاربیسو و همکاران، ۲۰۰۲).

خوش‌بختانه برای چیره شدن به این محدودیتِ پالایش فلزهای خاک توسط باکتری‌ها، امکان بهره‌گیری از گیاهان که می‌توانند فلزها را از خاک آلوده بیرون ببرند افزایش یافته است. در این راستا امروزه به گیاه‌پالایی که«بهره‌گیری از گیاه سبز برای حذف آلاینده‌ها از محیط یا بی‌زیان ساختن آن» است (کانینگهام و برتی، ۱۹۹۳؛ راسکین و همکاران، ۱۹۹۴) به عنوان جایگزین بوم‌شناختی روش‌های پالایش فیزیکی و شیمیایی آسیب‌زا نگاه می‌شود (مئاگر، ۲۰۰۰). این فنّاوری گیاهی به عنوان فرایند پالایش کارآمد، غیر مخرب، ارزان، دارای منظره زیبا و مورد پذیرش اجتماعی گزارش شده است (گاربیسو و همکاران، ۲۰۰۲). جنبه‌های فنّی گیاه‌پالایی به همراه برتری‌ها و کاستی‌های آن در منابع دیگر آمده است (چانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ راسکین و همکاران، ۱۹۹۷؛ سالت و همکاران، ۱۹۹۸؛ آلکورتا و گاربیسو، ۲۰۰۱؛ گاربیسو و آلکورتا، ۲۰۰۱؛ گاربیسو و همکاران، ۲۰۰۲؛ مک‌گراث و همکاران، ۲۰۰۲؛ آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴b, d؛ پیلون-اسمیتس، ۲۰۰۵).

در زمینه گیاه‌پالایی چندین روش تعریف شده است: استخراج با گیاهان، فیلترکردن با گیاهان، پایدارسازی با گیاهان، تصعید با گیاهان، تجزیه با گیاهان، تغییرشکل آلاینده با گیاهان و ... (گاربیسو و همکاران، ۲۰۰۲). در زمینه پالایش فلزهای خاک دو مورد از این روش‌ها شامل استخراج با گیاهان و پایداری با گیاهان رایج‌تر هستند. در پایان تاکید این نکته مهم است که از منظر بوم‌شناختی هدف نهایی هر فرایند پالایش خاک، باید نه تنها حذف آلاینده از خاک باشد، بلکه بازیابی سلامت خاک نیز در دستورکار قرار گیرد (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a، اِپلده و همکاران، ۲۰۰۸).

۱۶-۲-۱- استخراج پیوسته فلزها با گیاهان

واژه استخراج با گیاهان به بهره‌گیری از گیاهان در حذف آلاینده‌ها (بیشتر فلزها) از خاک برمی‌گردد. به ویژه اینکه «استخراج گیاهی پیوسته» بر اساس بهره‌گیری از گیاهانی است که فلزها را بیشتر در خود انباشته می‌کنند (بیش‌اندوزها[1]) و گنجایش انباشت، جابه جایی و بردباری غلظت‌های بالایی از فلزها را در چرخه رشد کامل خود دارند (سالت و همکاران، ۱۹۹۵؛ بیکر و همکاران، ۲۰۰۰). در این راستا گیاه *تالسپی کرولسنس*[2] (پنی کرس یا پنی گرس آلپ[3]) یک گیاه بیش‌اندوز است که به دلیل گنجایش یا توان چشمگیر آن در استخراج روی و کادمیوم از خاک‌های آلوده به طور گسترده مطالعه شده (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a, b؛ اِپلده و همکاران، ۲۰۰۸) و به عنوان گونه مدل برای پژوهش درباره‌ی استخراج گیاهی فلزها پیشنهاد شده است (آسونسائو و همکاران، ۲۰۰۳).

در یک پژوهش، گونه بومی[4] *تالسپی* به نام «لانستوسا»[5] از ایالت باسک[6] (جنوب اسپانیا) مورد بررسی قرار گرفت تا ۱) پتانسیل این اکوتیپ در استخراج روی را ارزیابی کند و ۲) پیامد فرایند استخراج که شامل رشد گیاه و استخراج فلز است را بر شاخص‌های میکروبی سلامت خاک بررسی کند. برای این اهداف جوانه‌های این گیاه به گلدان‌های ۲/۵ کیلوگرمی منتقل شدند. خاک این گلدان‌ها با ۱۰۰۰ mg Zn kg^{-1} (بر اساس وزن خشک) آلوده شده و با ۱۲۰ mg kg^{-1} (بر اساس وزن خشک) نیتروژن، فسفر و پتاسیم کوددهی شده بودند. پس از سه ماه رشد، این گیاه به طور میانگین ۵۶۵۴ میلی‌گرم روی در هر کیلوگرم وزن خشک ریشه انباشته کرده و ۲۸/۹ میلی‌گرم روی از هر گلدان را استخراج کرد. افزون بر این در پایان آزمایش CLPPs هم روی Biolog EcoPlatesTM گرفته شد. در جدول ۱۶-۱، AWCD، شاخص سرشار بودن[7] (S)، و تنوع شانون[8] (H') روی داده‌های Biolog EcoPlates در ۵۲ ساعت انکوباسیون آمده است. همان‌گونه که در جدول ۱۶-۱ دیده می‌شود در عدم حضور گیاه، آلودگی روی، سبب کم شدن همه این فراسنجه‌ها در مقایسه با خاک غیرآلوده شاهد شد. با این حال، در نتیجه رشد گیاه *تالسپی* و استخراج فلز، اندازه‌های این فراسنجه‌ها دوباره افزایش یافت که نشان می‌دهد بخش قابل کشت جامعه میکروبی هتروتروف خاک، توان خود در بهره‌گیری از بستره‌ی کربن‌دار (تنوع عملکردی) را

1. Hyperaccumulators
2. *Thlaspi caerulescens*
3. Alpine pennycress or alpine pennygrass
4. Ecotype
5. Lanestosa
6. Basque
7. Richness
8. Shannon's diversity

بازیابی کرده است. برای همه فراسنجه‌های تنوع عملکرد میکروبی، مشاهده شد که حضور گیاه مهم‌تر از اندازه‌ی فلز استخراج شده از خاک است (در واقع در این آزمایش، این مقدار بسیار پایین بود). گفته شده است که خاک دارای پوشش گیاهی، به دلیل حضور سطوح بیشتر برای تشکیل کلنی میکروبی و ماده آلی رها شده توسط ریشه گیاهان، فعالیت میکروبی بالایی در مقایسه با خاک لُخت دارد (تِیت، ۱۹۹۵؛ گریستون و همکاران، ۱۹۹۷؛ دلمور و همکاران، ۲۰۰۱). در آزمایش مشابه با همین گیاه در خاک رایزوسفری در مقایسه با خاک غیر رایزوسفری فعالیت زیستی بالایی دیده شد (گرمیون و همکاران، ۲۰۰۴؛ کِلِر و هَمر، ۲۰۰۴؛ هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۶، اِپلده و همکاران، ۲۰۰۸). سرانجام در راستای بازیابی سلامت خاک در پی استخراج گیاهی، که در مقادیر فراسنجه‌های میکروبی خاک منعکس می‌شود، هدف ایده‌آل باید برگشت به شرایط خاک شاهد معتبر، یعنی یک خاک غیرآلوده دارای پوشش گیاهی با ویژگی‌های فیزیکی وشیمایی مشابه که در شرایط اقلیمی کشاورزی یکسانی قرار دارد، باشد.

جدول ۱۶-۱ اندازه‌های میانگین AWCD و شاخص‌های تنوع محاسبه شده از داده‌های Biolog EcoPlates در ۵۲ ساعت انکوباسیون در خاکی که محتوای روی آن با گیاه لانستوسا استخراج شده است. S، سرشار بودن و H’، تنوع شانون را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (n=3) ارائه شد ه است. مقادیر دارای حروف نامشابه دارای تفاوت آماری معنی‌دار (P< ۰/۰۵ یا پایین‌تر) بر اساس آزمون PLSD فیشر هستند.

خاک	AWCD	S	H’
کنترل، آلوده نشده	۰/۹۱±۰/۰۱^{ab}	۲۴±۱^{a}	۳±۰/۱^{a}
آلوده شده به فلز، کشت نشده	۰/۷۸±۰/۰۳^{a}	۱۸±۰^{b}	۲/۸±۰^{a}
آلوده شده به فلز، کشت شده	۱/۰۱±۰/۰۵^{b}	۲۴±۲^{a}	۳/۱±۰/۱^{a}

از دیدگاه پالایش، استخراج گیاهی نیاز به زیست‌توده قابل برداشت کافی دارد. متاسفانه، اکثر بیش‌اندوزهای فلزها (مانند *تالسپی*) در کل نسبتاً کوچک هستند و نرخ تولید زیست توده آن‌ها پایین است و عملیات کاشت و برداشت و مدیریت آفات ندارند (ونزل و همکاران، ۱۹۹۹). در نتیجه امروزه گونه‌های گیاهی تند رشد با تولید زیست توده بالا که مقادیر متوسط فلز را در ریشه‌ی خود انباشته می‌کنند، برای استخراج گیاهی آزمایش شده‌اند (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۸). گذشته از آن، در برخی موارد گزارش شده است که بالا بودن زیست توده اندام هوایی، غلظت پایین فلز را در آن جبران می‌کند (اِبس و کوچیان، ۱۹۹۷).

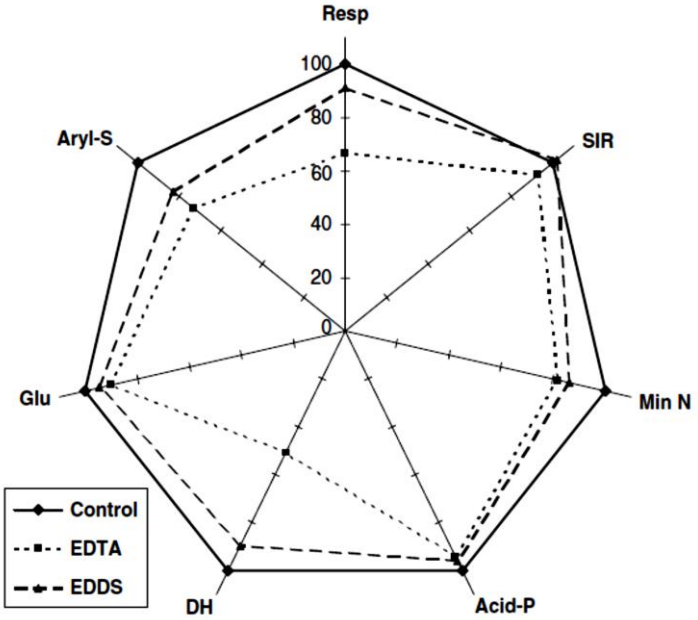
۱۶-۲-۲- استخراج گیاهی القا شده با کلات

شـــناســـایی و بهره‌گیری از عوامل کلات کننده در خاک جذب و جابه جایی فلزها توســـط گیاه را افزایش داده و امکاناتی برای اســـتخراج گیاهی ایجاد کرده اســـت (بلای لاک و همکاران، ۱۹۹۷) که مهم‌ترین آن اســـتفـاده از گیـاهان با زیســـت توده بالا در پالایش خاک‌های آلوده به فلزها به ویژه فلزهای با زیســت فراهمی پایین مانند سرب است (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۷). به هر حال از پیامدهای جانبی افزودن این عوامل کلات کننده به خاک مانند آب شـویی فلزها و پیامدهای سـمی روی جوامع میکروبی خاک معمولاً چشـم‌پوشـی شـده اسـت (رامکنس و همکاران، ۲۰۰۲). در این راسـتا، بیشـتر پژوهش‌ها روی اسـتخراج گیاهی با کلات‌ها، روی اسـتخراج گیاهی سرب با EDTA (اتیلن دی‌آمین تترا اسـتیک اسـید) متمرکز بوده است (مک‌گراث وهمکاران، ۲۰۰۲). ولی EDTA وکمپلکس‌های تشـکیل شـده EDTA-Pb دسـترسـی زیسـتی پایین و حلالیت بالا دارند که سبب افزایش خطر پیامدهای نامناسـب زیسـت محیطی به دلیل پویایی فلز و ماندگاری بالای آن می‌شود (آلکورتا و همکاران ، ۲۰۰۴d). اتیلن دی‌آمین دی‌ســـوکســـینات (EDDS) به عنوان جایگزین در اسـتخراج گیاهی فلزها با کمک کلات پیشـنهاد شـده اسـت (گرتمن و همکاران، ۲۰۰۳؛ سانتوس و همکاران، ۲۰۰۶). دیده شـده اسـت که EDDS به آسـانی تجزیه می‌شـود (جاورسـکا و همکاران، ۱۹۹۹)، کمپلکس‌هـای نیرومند با فلزهای واســـطه و رادیونوکلئیدها ایجاد می‌کند (جونز و ویلیامز، ۲۰۰۱)، نسـبت به EDTA سـرب کمتری را در خاک آب شـویی می‌کند و برای ریزجانداران خاک هم سمیت کمتری دارد (گرتمن و همکاران، ۲۰۰۳). با این حال، پیش از توسعه و تجاری شدن این فنّاوری پالایشی، روش‌های زیست محیطی سالم برای استخراج گیاهی با کلات‌ها بایستی ارائه شوند (آلکورتا و همکاران، ۲۰۰۴d).

به عنوان یک نمونه شـکل ۱۶-۲، پاسـخ چند فراسنجه میکروبی به افزودن EDTA و EDDS (یک گرم در کیلوگرم وزن خشـک خاک) در یک آزمایش اسـتخراج گیاهی با گیاه کنگر فرنگی[1] در خاکی که به صـورت مصـنوعی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک خشک آلوده شده بود را نشـان می‌دهد. در انباشـت سـرب در اندام هوایی، EDTA (۴۲۸/۴ میلی‌گرم سرب در هر کیلوگرم وزن خشـک اندام هوایی) کارایی بیشـتری از EDDS (۲۰/۸ میلی‌گرم سـرب در هر کیلوگرم وزن خشـک ریشـه) داشـت. انباشـت سرب در گلدان شاهد نیز ۶/۳ میلی‌گرم سرب در هر کیلوگرم وزن خشـک اندام هوایی بود. با این حال، پیامد EDTA در مقایسه با EDDS بر فراسنجه‌های میکروبی خاک به ویژه فعالیت دهیدروژناز (که به طور میانگین نصـف شـد) و تنفس پایه منفی‌تر بود (شـکل

1. *Cynara cardunculus*

۱۶-۲). فعالیت دهیدروژناز که در همه میکروب‌های زنده دیده می‌شود و تنفس پایه هر دو به عنوان شاخص در بررسی فعالیت میکروبی کلی خاک به کار می‌روند (نانی‌پیری و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ۱۶-۲ پیامد عوامل کلات‌کننده (EDTA و EDDS) روی فراسنجه‌های زیستی خاک در یک آزمایش استخراج گیاهی سرب القا شده توسط کلات‌ها با گیاه کنگر فرنگی. به گلدان شاهد کلات‌کننده افزوده نشد و مقادیر برای آن به عنوان نقطه مرجع در نظر گرفته شد (مقادیر در خاک شاهد= ۱۰۰ درصد). Resp: تنفس پایه (شاخص فعالیت میکروبی خاک)، SIR: تنفس برانگیخته با سوبسترا (شاخصی برای پتانسیل زیست توده فعال میکروبی)، Min N: پتانسیل معدنی شدن نیتروژن (شاخص نرخ معدنی شدن نیتروژن)، DH: دهیدروژناز (شاخص کل فعالیت میکروبی خاک)، Glu: بتا-گلوکوزیداز (آنزیمی که نقش اصلی در هیدرولیز پلیمرهای بقایای گیاهی یعنی سلوبیوز ایفا می‌کند)، Aryl-S: آریل سولفاتاز (آنزیمی که استر سولفات‌های آلی را هیدرولیز کرده و سولفات آزاد می‌کند)، Acid-P: اسید فسفاتاز (آنزیمی که فسفات را از فسفر آلی رها می‌کند).

بنابراین، جدا از موثر بودن در القای استخراج گیاهی فلزها، کلات کننده‌ها باید تا حد امکان برای جامعه زیستی خاک نیز بی‌زیان باشند. گذشته از این، افزودن کلات‌کننده‌ها به خاک ممکن است سبب افزایش فراهمی فلز برای ریزجانداران خاک شود (ولپ و برومر، ۱۹۹۷) و از آنجایی که ریزجانداران خاک به طور مستقیم و غیرمستقیم به محلول خاک برای جذب آب و غذا نیاز دارند،

بالا رفتن غلظت فلز در محلول خاک می‌تواند سبب پیامدهای زیان‌بار برای جامعه میکروبی خاک شود (رامکنس و همکاران، ۲۰۰۲).

۱۶-۲-۳- پایدارسازی با گیاهان

پالایش خاک‌های آلوده به فلز (به ویژه آن‌هایی که سطح آلودگی بالایی دارند) با استفاده از فرآیند استخراج گیاهی معمولاً چندین سال و به احتمال زیاد چند دهه طول می‌کشد. برای چیرگی بر این پاشنه آشیل، استخراج گیاهی یعنی زمان طولانی پالایش کارآمد، پیشنهاد شده که این فنّاوری گیاهی با اقدامات سودرسان مانند جنگل‌داری یا تولید انرژی زیستی[1] ترکیب شود (رابینسون و همکاران، ۲۰۰۳). یک فنّاوری گیاهی جایگزین برای پالایش خاک‌های آلوده به فلز، پایدارسازی گیاهی یا بهره‌گیری از گیاهان برای کاهش فراهمی زیستی آلاینده‌ها در محیط است. به طور ویژه، پایدارسازی به معنی تثبیت آلاینده در رایزوسفر از راه جذب و انباشت به وسیله ریشه، جذب سطحی روی ریشه، یا رسوب در ناحیه ریشه گیاهان است به گونه‌ای که از جابه جایی آن توسط فرسایش بادی و آبی، آب شویی و انتشار خاک جلوگیری شود (EPA, ۲۰۰۰). بنابراین اگرچه فلز از خاک حذف نمی‌شود اما از پیامدهای زیان‌بار زیست محیطی آن کاسته می‌شود. گزینش راه‌کار گیاه‌پالایی فلز (استخراج گیاهی یا پایدارسازی) به عوامل مختلفی مانند نوع فلز موجود در خاک، سطح آلودگی فلز، کاربری بعدی جایگاه آلوده و ... وابسته است. اگر بشود هر دو روش را به گونه‌ای ترکیب کرد که برتری یکی، کاستی دیگری را پوشش دهد، بسیار نوید بخش خواهد بود.

پایدارسازی شیمیایی گیاهی[2] یعنی ترکیب روش‌های شیمیایی (مانند افزودن اصلاح کننده‌های آلی و معدنی به خاک) به همراه پایدارسازی گیاهی (ناکس و همکاران، ۲۰۰۰) برای پالایش خاک‌های آلوده به فلز بسیار اُمیدبخش است. برای کاهش زیست فراهمی فلزها، اصلاح کننده‌هایی مانند منابع گوناگون ماده آلی به خاک افزوده شده است. به گونه‌ای که این مواد از راه تشکیل کمپلکس‌های نامحلول آلی فلزی با اسید هیومیک خطر سمیت فلز برای گیاه و میکروب‌ها را کم می‌کنند (استیونسون و همکاران، ۱۹۷۲؛ کیرک‌هام، ۱۹۷۷). ترکیب این دو روش بسیار جالب است. زیرا مواد شیمیایی به مازاد فلز متصل می‌شوند، pH را کنترل می‌کند و عناصر غذایی برای گیاه فراهم می‌کنند و گیاه هم جلوی فرسایش بادی را می‌گیرد، آب شویی را کاهش می‌دهد و فلزها را در ریشه‌های خود انباشته می‌کند.

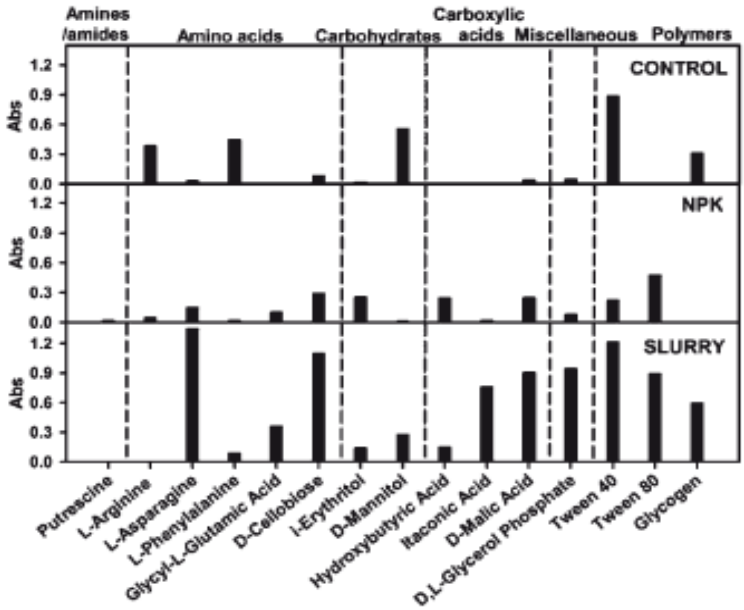
پیش‌تر پیامد تحریک کنندگی گیاهان بر جامعه میکروبی خاک را در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلز گزارش کردیم (هرناندز-آلیسا و همکاران، ۲۰۰۶a؛ اِپلده و همکاران، ۲۰۰۸). اما در

---

1. Bioenergy
2. Chemophytostabilization

پایدارسازی شیمیایی گیاهی لازم است که پیامد اصلاح کننده‌ها هم، بر جامعه میکروبی خاک در نظر گرفته شود. در این راستا آزمایشی در خاک معدن با آلودگی متوسط که به ترتیب ۱۰۰۰، ۳۴۰، و ۲/۶ میلی‌گرم روی، سرب و کادمیوم در هر کیلوگرم خاک خشک داشت و با کود مایع گاوی که دارای ۱۲ درصد ماده خشک (DM) و به ترتیب ۳/۲۵ ، ۰/۹ و ۳ درصدِ ماده خشک نیتروژن، فسفر و پتاسیم بود و به مقدار ۰/۱ لیتر در کیلوگرم خاک خشک استفاده شده بود و همین‌طور کود شیمیایی اوره به اضافه ۱۴ درصد کود PK که به همان اندازه‌ی کود گاوی استفاده شده بود، انجام گرفت. بیست هفته پس از افزودن اصلاح‌کننده‌ها، غلظت فلزهای زیست فراهم خاک (عصاره‌گیری شده با کلرید کلسیم) به مقدار معنی‌داری کاهش یافت. به طوری که در خاکی که کود شیمیایی دریافت کرده بود غلظت روی، سرب و کادمیوم زیست فراهم به ترتیب ۴۵، ۶۲ و ۳۸ درصد، و در خاکی که کود گاوی دریافت کرده بود به ترتیب ۳۴، ۵۰ و ۳۳ درصد کاهش یافته بود. همین‌طور فعالیت آنزیم دهیدروژناز در هر دو خاک اصلاح شده (به ترتیب در خاک شاهد، اصلاح شده با کود معدنی و کود گاوی ۰/۲، ۱۲ و ۷۷/۴ میلی‌گرم INTF در کیلوگرم خاک خشک در ۲۰ ساعت) افزایش یافت که نشان دهنده پیامد تحریک کنندگی اصلاح‌کننده‌ها بر جامعه میکروبی خاک است.

از آنجا که تنوع زیستی جامعه میکروبی خاک نقش کلیدی در حفظ حاصل‌خیزی خاک، عملکرد و انعطاف‌پذیری آن دارد، در آزمایش بالا تنوع عملکردی میکروبی به روش CLPPs با Biolog EcoPlates در خاک‌های شاهد و اصلاح شده تعیین شد. شکل ۱۶-۳ رد متابولیکی CLPPs در خاک‌های شاهد و اصلاح شده را نشان می‌دهد. برای بهتر نشان دادن نتایج تنها سوبستراهایی که تفاوت چشم‌گیر بین تیمارها در آن‌ها دیده می‌شد، آمده است. همان‌گونه که دیده می‌شود افزودن کود معدنی به خاک سبب الگوی متفاوت بهره‌گیری از سوبسترای کربن توسط جامعه میکروبی هتروتروف خاک شد. افزودن کود گاوی به خاک سبب بالا رفتن تنوع عملکردی در خاک معدنی آلوده شد (شکل ۱۶-۳). در این خاک، ممکن است که ماده آلی ساده تجزیه شونده کود گاوی سبب بهبود تنوع عملکرد میکروبی خاک شده باشد. پیش‌تر گزارش شده که افزودن کود دامی و کمپوست به خاک تنوع عملکرد میکروبی را تا اندازه معنی‌داری بر اساس داده‌های Biolog افزایش می‌دهد (گومز و همکاران، ۲۰۰۶؛ تویوتا و کونیناگا، ۲۰۰۶).



شکل ۱۶-۳ رد متابولیکی الگوی بهره‌گیری از سوبسترا به دست آمده از EcoPlates در ۴۴ ساعت انکوباسیون در خاک شاهد، اصلاح شده با کود شیمیایی (NPK= اوره به اضافه PK ۱۴ درصد) و کود گاوی. برای نمایش بهتر تنها سوبستراهایی آورده شده‌اند که تفاوت معنی‌داری (بر اساس ANOVA) بین تیمارها در آن‌ها وجود داشته است.

۱۶-۳- نتیجه‌گیری

با وجود گرایش منطقی به بهبود گنجایش استخراج فلز توسط گیاهان (استخراج گیاهی) یا کاهش زیست فراهمی گیاهی فلز، آب شویی و انتشار با استفاده از گیاهان (پایدارسازی گیاهی)، نباید فراموش کرد که هدف پایانی هرگونه فرایند پالایش نه تنها باید حذف آلاینده از خاک آلوده باشد، بلکه مهم‌تر این است که گنجایش پیوسته و توان خاک برای کار (سلامت خاک) به آن برگردانده شود. در واقع در برخی موارد بازگرداندن سلامت خاک بدون کاهش غلظت فلز خاک در آن بر اساس استانداردها و قوانین مختلف می‌تواند امکان‌پذیر باشد (بیشتر قوانین کنونی درباره‌ی سمیت فلزها در خاک هنوز هم مبتنی بر غلظت کل فلز است که درست بودن آن به عنوان مبنایی برای حد سمیت فلزها در خاک جای پرسش دارد).

در این راستا اگرچه تا به امروز تاکیدها بیشتر بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به عنوان شاخص‌های سلامت خاک بوده است، اما بهره‌گیری از فراسنجه‌های زیستی نیز به دلیل حساس‌تر بودن نسبت به دگرگونی‌ها در خاک و همین‌طور گنجایش آن‌ها برای فراهم کردن اطلاعاتی که

بیشـــترِ فاکتورهای محیطی را یکپارچه می‌کنند، روز به روز بیشتر می‌شود. به ویژه آن فراسنجه‌های زیســتی که به اندازه، فعالیت و تنوع میکروب‌های خاک ربط دارند، بیشتر مفید هستند و تا اندازه‌ی زیادی پاسـخ‌گوی عملکرد خاک هستند. شاخص‌های میکروبی سلامت خاک ابزارهای معتبری برای ارزیابی موفقیت فرایندهای استخراج گیاهی و پایدارسازی گیاهی هستند.

در پایان لازم به ذکر اسـت که خاک‌های آلوده به فلز و گیاه‌پالایی شده سناریوهای جالبی برای آگـاهی بیشـــتر و درک عمیق‌تر برهم‌کنش‌هـای گیـاه-میکروب که در زیر زمین رخ می‌دهند و پی بردن به اینکه کدام‌یک نقش حیاتی در عملکرد زیسـت‌بوم‌های خاکی دارند، هستند. گذشته از این، محیط‌های به هم خورده معمولاً دیدگاه بهتری دربازه‌ی کار سامانه ارائه می‌دهند.

منابع

Alkorta I, Garbisu C (2001) Phytoremediation of organic contaminants in soils. Biores Technol 79:273–276.

Alkorta I, Amezaga I, Albizu I, Aizpurua A, Onaindia M, Buchner V, Garbisu C (2003a) Molecular microbial biodiversity assessment: a biological indicator of soil health. Rev Environ Health 18:131–151.

Alkorta I, Aizpurua A, Riga P, Albizu I, Amezaga I, Garbisu C (2003b) Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. Rev Environ Health 18:65–73.

Alkorta I, Albizu I, Amezaga I, Onaindia M, Buchner V, Garbisu C (2004a) Climbing a ladder: a step-by-step approach to understanding the concept of agroecosystem health. Rev Environ Health 19:141–159.

Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C (2004b) Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. Rev Environ Sci Bio/Technol 3:71–90.

Alkorta I, Hernández-Allica J, Garbisu C (2004c) Plants against the global epidemic of arsenic poisoning. Environ Int 30:949–951.

Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Onaindia M, Garbisu C (2004d) Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. Rev Environ Sci Bio/ Technol 3:55–70.

Alkorta I, Epelde L, Mijangos I, Amezaga I, Garbisu C (2006) Bioluminiscent bacterial biosensors for the assessment of metal toxicity and bioavailability in soils. Rev Environ Health 21:121–134.

Assunção AGL, Schat H, Aarts MGM (2003) Thlaspi caerulescens, an attractive model species to study heavy-metal hyperaccumulation in plants. New Phytol 159:351–360.

Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos G (eds) Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publisher, Boca Raton, pp 85–107.

Bezdicek DF, Papendick RI, Lal R (1996) Introduction: importance of soil quality to health and sustainable land management. In: Doran JW, Jones AJ (eds) Methods for assessing soil quality.
SSSA Special Publication 49, Soil Science Society of America, Madison WI, pp 1–8.

Blaylock MJ, Salt DE, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley BD, Raskin I (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environ Sci Technol 31:860–865.

Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM (1997) Phytoremediation of soil metals. Curr Opin Biotechnol 8:279–284.

Coleman DC, Hendrix PF, Odum EP (1998) Ecosystem health: an overview. In: Huang PM, Adriano DC, Logan TJ, Checkai RT (eds) Soil chemistry and ecosystem health. Soil Science Society of America, Madison WI, pp 1–20.

Collins YE, Stotzky G (1989) Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. In: Beveridge TJ, Doyle RJ (eds) Metal ions and bacteria. Wiley, Toronto, pp 31–91.

Costanza R, Norton BG, Haskell BD (1992) Ecosystem health. New goals for environmental management. Island Press, Washington DC.

Costanza R, Mageau M, Norton B, Patten BC (1998) What´s sustainability? In: Rapport D, Costanza R, Epstein PR, Gaudet C, Levins R (eds) Ecosystem health. Blackwell Science, Oxford, pp 231–239.

Cunningham SD, Berti WR (1993) Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. Vitro Cell Dev Biol 29:207–212.

Dasappa SM, Loehr RC (1991) Toxicity reduction in contaminated soil remediation processes. Water Res 25:1121–1130.

Delorme TA, Gagliardi JV, Angle JS, Chaney RL (2001) Influence of the zinc hyperaccumulator Thlaspi caerulescens J & C. Presl. and the nonmetal accumulator Trifolium pratense L. on soil microbial populations. Can J Microbiol 47:773–776.

Doran JW, Parkin TB (1994) Defining and assessing soil quality. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdiceck DF, Stewart BA (eds) Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA Special Publication 35, Soil Science Society of America, Madison WI, pp 3–21.

Doran JW, Parkin TB (1996) Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: Doran JW, Jones AJ (eds) Methods for assessing soil quality. SSSA Special Publication 49, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 25–37.

Doran JW, Safley M (1997) Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, pp 1–28.

Ebbs SD, Kochian LV (1997) Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. J Environ Qual 26:776–781.

EPA (2000) Introduction to phytoremediation. National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati.

Epelde L, Becerril JM, Hernández-Allica J, Barrutia O, Garbisu C (2008) Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from Thlaspi caerulescens growth and metal phytoextraction. Appl Soil Ecol 39:299–310.

Garbisu C, Alkorta I (1997) Bioremediation: principles and future. J Clean Technol Environ Toxicol Occup Med 6:351–366.

Garbisu C, Alkorta I (1999) Utilization of genetically engineered microorganisms (GEMs) for bioremediation. J Chem Technol Biotechnol 74:599–606.

Garbisu C, Alkorta I (2001) Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. Biores Technol 77:229–236.

Garbisu C, Alkorta I (2003) Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. Eur J Min Proc Environ Protect 3:58–66.

Garbisu C, Hernández-Allica J, Barrutia O, Alkorta I, Becerril JM (2002) Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. Rev Environ Health 17:173–188.

Gómez E, Ferreras L, Toresani S (2006) Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. Biores Technol 97:1484–1489.

Grayston SJ, Vaughan D, Jones D (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Appl Soil Ecol 5:29–56.

Grčman H, Vodnik D, Velikonja-Bolta S, Leštan D (2003) Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. J Environ Qual 32:500–506.

Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W, Harms H (2004) Impacts of heavy-metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a 12-month microcosm experiment. FEMS Microbiol Ecol 48:273–283.

Hernández-Allica J, Becerril JM, Zárate O, Garbisu C (2006a) Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. Plant Soil 281:147–158.

Hernández-Allica J, Garbisu C, Becerril JM, Barrutia O, García-Plazaola JI, Zhao FJ, McGrath SP (2006b) Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in Thlaspi caerulescens. Plant Cell Environ 29:1422–1429.

Hernández-Allica J, Becerril JM, Garbisu C (2008) Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. Environ Pollut 152:32–40.

Hernández-Allica J, Garbisu C, Barrutia O, Becerril JM (2007) EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. Environ Exp Bot 60:26–32.

Hildén M, Rapport DJ (1993) Four centuries of cumulative impacts on a Finnish river and its estuary: an ecosystem health-approach. J Aquat Ecosyst Health 2:261–275.

Huang PM, Adriano DC, Logan TJ, Checkai RT (1998) Preface. In: Huang PM, Adriano DC, Logan TJ, Checkai RT (eds) Soil chemistry and ecosystem health. Soil Science Society of America, Madison WI, p viii.

Janke RR, Papendick RI (1994) Preface. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdiceck DF, Stewart BA (eds) Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA Special Publication 35, Soil Science Society of America, Madison WI, pp ix–xi.

Jaworska JS, Schowanek D, Feijtel TCJ (1999) Environmental risk assessment for trisodium [S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. Chemosphere 38:3597–3625.

Jones PW, Williams DR (2001) Chemical speciation used to assess [S,S’]-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) as a readily-

biodegradable replacement for EDTA in radiochemical decontamination formulations. Appl Radiat Isot 54:587–593.

Kandeler E (2007) Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: Eldor AP (ed) Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic, Oxford, pp 53–80.

Keller C, Hammer D (2004) Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of Thlaspi caerulescens in metal contaminated soils. Environ Pollut 131:243–254.

Kirkham MB (1977) Organic matter and heavy metal uptake. Compost Sci 18:18–21.

Knox AS, Seaman J, Adriano DC, Pierzynski G (2000) Chemophytostabilization of metals in contaminated soils. In: Wise DL, Trantolo DJ, Cichon EJ, Inyang HI, Stottmeister U (eds) Bioremediation of contaminated soils. Marcel Dekker, New York, pp 811–836.

Larson JL, Zak DR, Sinsabaugh RL (2002) Extracellular enzyme activity beneath temperate trees growing under elevated carbon dioxide and ozone. Soil Sci Soc Am J 66:1848–1856.

Loreau M (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. Oikos 91:3–17.

Luo Y, Zhou X (2006) Preface. In: Luo Y, Zhou X (eds) Soil respiration and the environment. Academic, Oxford, pp ix–x.

Mageau MT, Constanza R, Ulanowicz RE (1995) The development and initial testing of a quantitative assessment of ecosystem health. Ecosyst Health 1:201–213.

Malik S, Beer M, Megharaj M, Naidu R (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. Environ Int 34:265–276.

McGrath SP (1987) Long-term studies of metal transfers following applications of sewage sludge. In: Coughtrey PJ, Martin MH, Unsworth MH (eds) Pollutant transport and fate in ecosystems. Special Publication No. 6 of the British Ecological Society, Blackwell Scientific, Oxford, pp 301–317.

McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E (2002) Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. Adv Agron 75:1–56.

Meagher RB (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Curr Opin Plant Biol 3:153–162.

Mijangos I, Pérez R, Albizu I, Garbisu C (2006) Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. Enzyme Microb Technol 40:100–106.

Nannipieri P, Kandeler E, Ruggiero P (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns RG, Dick RP (eds) Enzymes in the environment. Marcel Dekker, New York, pp 1–33.

Odum EP (1981) The effects of stress on the trajectory of ecological succession. In: Barrett GW, Rosenberg R (eds) Stress effects on natural ecosystems.Wiley, Chichester, pp 43–47.

Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (1997) Biological indicators of soil health: synthesis. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, pp 419–435.

Pearce F (2003) Arsenic´s fatal legacy grows. New Sci 179:4–5.

Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. Annu Rev Plant Biol 56:15–39.

Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. FEMS Microbiol Ecol 42:1–14.

Rapport D (1998) Defining ecosystem health. In: Rapport D, Costanza R, Epstein PR, Gaudet C, Levins R (eds) Ecosystem health. Blackwell Science, Oxford, pp 18–33.

Rapport DJ, McCUllum J, Miller MH (1997) Soil health: its relation to ecosystem health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, pp 29–47.

Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. Curr Opin Biotechnol 5: 285–290.

Raskin I, Smith RD, Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. Curr Opin Biotechnol 8:221–226.

Reichle DE (1997) The role of soil invertebrates in nutrient cycling. In: Lohm V, Persson T (eds) Soil organisms as components of ecosystems. Swedish Natural Science Research Council, Stockholm, pp 145–156.

Robinson B, Fernández JE, Madejón P, Marañón T, Murillo JM, Green S, Clothier B (2003) Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. Plant Soil 249:117–125.

Römkens P, Bouwman L, Japenga J, Draaisma C (2002) Potentials and drawbacks of chelateinduced phytoremediation of soils. Environ Poll 116:109–121.

Rozas MA, Alkorta I, Garbisu C (2006) Phytoextraction and phytofiltration of arsenic. Rev Environ Health 21:43–56.

Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation: a novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnol 13:468–474.

Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. Annu Rev Plant Physiol 49:643–668.

Santos FS, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amaral-Sobrinho N, Mazur N, Garbisu C (2006) Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with Brachiaria decumbens. Chemosphere 65:43–50.

Stevenson FJ, Ardakani MS (1972) Organic matter reactions involving micronutrients in soils. In: Mortvedt JJ, Giordano PM, Lindsay WL (eds) Micronutrients in agriculture. SSSA, Madison WI, pp 79–114

Tate RL (1995) Soil microbiology. Wiley, New York.

Torsvik V, Øvreås L (2007) Microbial phylogeny and diversity in soil. In: Van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT (eds) Modern soil microbiology, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, pp 23–54.

Toyota K, Kuninaga S (2006) Comparison of soil microbial community between soils amended with or without farmyard manure. Appl Soil Ecol 33:39–48.

Wang AS, Angle JS, Chaney RL, Delorme TA, McIntosh M (2006) Changes in soil biological activities under reduced soil pH during Thlaspi caerulescens phytoextraction. Soil Biol Biochem 38:1451–1461.

Welp G, Brümmer GW (1997) Microbial toxicity of Cd and Hg in different soils related to total and water-soluble contents. Ecotoxicol Environ Saf 38:200–204.

Wenzel WW, Salt D, Smith R, Adriano DC (1999) Phytoremediation: a plant–microbe-based remediation system. In: Adriano DC, Bollag JM, Frankenberger W, Sims R (eds) Bioremediation of contaminated soils. SSSA Special Monograph 37, Madison WI, pp 457–510.

فصل هفدهم

محیط و ابزارها در ریشه‌پالایی و زیست‌پالایی خاک آلوده

A.K.J. Surridge, F.C. Wehner, and T.E. Cloete

۱۷-۱- تکنیک‌های ارزیابی جوامع میکروبی بدون کشت آن‌ها

بخش قابل کشت جوامع باکتریایی محیطی در مقایسه با تعداد گونه‌های موجود بسیار ناچیزند. بنابراین تکنیک‌های کشت آزمایشگاهی برای آنالیز تنوع جوامع باکتریایی محیطی در حال منسوخ شدن هستند. اُورِآس و تورسویک (۱۹۹۸) تنوع باکتری‌های قابل کشت خاک‌های کشاورزی را با تنوع به دست آمده از روش‌های مولکولی مقایسه کردند. آن‌ها دریافتند که روش‌های مولکولی، تنوع باکتریایی بسیار بیشتری از تکنیک‌های جداسازی کلاسیک ارائه می‌دهند و به این نتیجه رسیدند که مطالعات تنوع باکتریایی باید کل جامعه باکتریایی و نه فقط بخش قابل کشت آن‌ها را دربرگیرد.

چندین تکنیک مولکولی برای شناسایی و تعیین تنوع گونه‌ای ریزجانداران بدون جداسازی آن‌ها ارائه شده‌اند (کاوایی و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر PCR در پژوهش‌ها، از کارهای شناسایی گرفته تا انگشت‌نگاری و کاوش ژنوم، روز به روز در حال افزایش است (تورسویک و اُورِآس، ۲۰۰۲). از PCR به دلیل توانایی این تکنیک در شناسایی تعداد نسبتاً کم جانداران هدف بدون نیاز به کشت یاخته، معمولاً برای ارزیابی نمونه‌های محیطی استفاده می‌شود (ولوسیوک وهمکاران، ۱۹۹۵). بنابراین از PCR می‌توان برای شناسایی انواع خاصی از ژن‌هایی که انتظار می‌رود در جوامع ویژه‌ای باشند و کارهای مشخص را انجام دهند، استفاده کرد. سِی و همکاران (۲۰۰۳) مجموعه‌ای از آغازگرها[1] برای شناسایی و پایش باکتری‌های تجزیه کننده‌ی آلکان ارائه کردند. این آغازگرها برای شناسایی نواحی همولوگ ژن‌های آلکان هیدروکسیلاز[2] (ژن‌های alk) طراحی شده بودند و بنابراین توانایی تجزیه‌کنندگی آلکان را در یک محیط ویژه ارزیابی می‌کنند. این آغازگرها در جوامعی که می‌توانند n-آلکان (مهم‌ترین جزء نفت خام) را تجزیه کنند، تست شدند. سِی و همکاران (۲۰۰۳) دریافتند که زنجیره‌های کوتاه‌تر n-آلکان ابتدا توسط گروه I باکتری‌های تجزیه کننده آلکان تجزیه می‌شوند. در حالی که گروه III باکتری‌های تجزیه کننده آلکان بعداً زنجیره‌های بلندتر آلکان را تجزیه می‌کنند. به هر حال، مانند بیشتر تکنیک‌ها در استفاده از PCR هم مشکلاتی وجود دارد که تکثیر ترجیحی نوع خاصی از توالی‌ها، تشکیل توالی‌های کایمری[3] و نتایج نادرست به دلیل آلودگی از این موارد هستند (اُسبورنه و همکاران، ۲۰۰۵). با این وجود PCR قابل اعتماد است و روش پایه در بیشتر کارهای زیست‌شناسی مولکولی است.

از مولکول‌های RNA ریبوزومی (rRNA) به عنوان زمان‌سنج‌های مولکولی[4] استفاده شده است. زیرا در آن‌ها توالی‌های عملکردی و ساختاری حفاظت شده بالایی وجود دارد. در نتیجه دامین‌هایی

---

1. Primers
2. Alkane hydroxylase
3. Chimeric
4. Molecular chronometers

در درون مولکول‌های rRNA هستند که تغییرات در توالی آن‌ها مستقل از هم‌دیگر است (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). روابط تبارشناسی[1] را می‌توان با بررسی این تغییرات در طول زمان تعیین کرد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲).

ارزیابی اولیه خاک‌ها با استفاده از روش‌های مستقل از کشت نشان داد که باکتری‌ها را می‌توان به سه گروه اصلی *پروتئوباکترها*[2]، *فیبروباکترها*[3] و باکتری‌های گرم-مثبت با GC پایین تقسیم‌بندی کرد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). ژن خاص کد کننده برای آنزیم‌هایی که در متابولیسم هیدروکربن‌ها درگیر هستند شناسایی شده‌اند. ویدمر و همکاران (۱۹۹۸) با هدف یافتن توانایی ریزجانداران محیطی در این زمینه و به طور خاص *سودوموناس‌ها*، روش شناسایی گزینشی *سودوموناس‌ها* مبتنی بر PCR در محیط را ارائه دادند. آن‌ها یک جفت آغازگر با گزینش‌پذیری بالا برای ژن‌های 16s rRNA گونه‌های *سودوموناس* طراحی کردند که دارای کارایی ۹۱/۷ درصدی در شناسایی باکتری‌ها از محیط، بر اساس توالی تبارشناسی بود. در ادامه میلسیک-ترزیک و همکاران (۲۰۰۱) و وایتِ و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از کاوشگرهای ژن‌های متابولیکی هیدروکربن‌ها یعنی *alkB* (تجزیه کننده n-پارافین ۶ تا ۳۲ کربنی)، *xylE* (تجزیه کننده تولوئن و زایلن) و *ndoB* (تجزیه کننده نفتالن)، روش‌های وابسته به کشت و آنالیزهای مولکولی را ترکیب کردند تا حضور میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها در خاک‌های آلوده را نشان دهند.

ریزجانداران تثبیت کننده نیتروژن می‌توانند ابزاری در زیست‌پالایی آلودگی هیدروکربن باشند (بخش ۴-۱-۲ را ببینید). اما کشت این ریزجانداران به دلیل نیازهای رشد و فیزیولوژی متفاوت که کشت هم‌زمان گونه‌های مجزا را محدود می‌کند، دشوار است (ویدمر و همکاران، ۱۹۹۹). امروزه با طراحی طیف گسترده‌ای از آغازگرهای دِجِنره [4]، روش‌های مولکولی برای تشخیص حضور باکتری‌ها و آرکئاهای تثبیت کننده نیتروژن در دسترس هستند. ژن *nifH* نشان‌گر عمومی در باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن است و آنزیم نیتروژن ریداکتاز[5] را کد می‌کند. در مورد این ژن، پایگاه داده‌ای وسیعی از توالی‌ها برای مقایسه وجود دارد. روسادو و همکاران (۱۹۹۸) تنوع توالی‌های ژن *nifH* در *پینی‌باسیلوس ازوتوفیکسنس* را مطالعه کردند و واگرایی توالی‌ها[6] در سطح DNA را پیدا کردند اما توالی‌ها در سطح پروتئین بیشتر حفاظت شده بودند. از این رو آغازگرهای دژنره طراحی شدند.

---

1. Phylogenetic relationships
2. *Proteobacteria*
3. *Fibrobacter*
4. Degenerate primers
5. Nitrogen reductase
6. Sequence divergence

ویدمر و همکاران (۱۹۹۹) دو مجموعه عمومی از توالی آغازگرهای دژنره را برای PCR آشیانه‌ای و بر اساس توالی‌های حفاظت شده آمینواسیدهای ژن *nifH* به کار گرفتند.

۱۷-۱-۱- آنالیز جامعه میکروبی

آنالیز جامعه میکروبی بدون کشت آن‌ها شامل استخراج مواد زیست شیمیایی شاخص از نمونه‌های محیطی است (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). برآورد اولیه از موجودات پروکاریوت خاک بدون کشت آن‌ها می‌گوید که در هر گرم خاک، ۴۶۰۰ ژنوم مجزا وجود دارد (تورسویک و همکاران، ۱۹۹۰a). DNA یا RNA استخراج شده می‌تواند از طریق تکنیک‌های ژنتیک مولکولی جفت شدن آنالیز جامعه میکروبی با تبارشناسی را آسان کند. شناسایی تنوع موجوداتی که غیرقابل کشت هستند گونه‌های با ارتباط خویشاوندی نزدیک با موجودات شناخته شده قابل کشت و همچنین گونه‌هایی از لاین‌های غیرقابل کشت را منعکس خواهد کرد (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳).

شناسایی ژن‌های میکروبی درگیر در تجزیه آلاینده‌های آلی سبب کاربرد تکنیک‌های مولکولی در بوم‌شناسی میکروبی نواحی آلوده شده است (میلسیک-ترزیک و همکاران، ۲۰۰۱). روش‌های مولکولی معمولاً شامل جداسازی قطعات[1] PCR بر اساس تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA و در بیشتر موارد ژن 16S rRNA است. در حالی‌که توان جداسازی رده‌بندی توالی‌های 16S rRNA برای تمایز بین موجوداتی که ارتباط نزدیک خویشاوندی دارند مانند سیانوباکتری‌ها کافی نیست، اما ناحیه رونویسی شده بین توالی[2] 16S و 23S در rRNA (rRNA-ITS) جداسازی بهتری از گونه‌ها به دست می‌دهد (جینسِ و همکاران، ۲۰۰۳). روش‌های مولکولی شامل: DGGE، آنالیز جداکننده بین ژنی ریبوزومی (RISA)، چندشکلی آرایش فضایی تک رشته‌ای[3] (SSCP)، آنالیز DNA ریبوزومی برش خورده تکثیر شده[4] (ARDRA) و چندشکلی در طول قطعات محدودالاثر انتهایی[5] (T-RFLP) است. تعدادی از این روش‌ها مانند SSCP، ARDRA و T-RFLP نمی‌توانند تنوع را نشان دهند مگر اینکه جامعه بسیار ساده باشد. زیرا تعداد کمی از نمونه‌ها که هیبریداسیون مجدد یا آنالیز توالی شده‌اند روی ژل دیده می‌شوند (ناکاتسو و همکاران، ۲۰۰۰؛ بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). به هر حال کاوش‌گرهای ژن‌های متابولیکی را می‌توان در هیبریداسیون اسید نوکلئیک و برای شناسایی توالی‌ها استفاده کرد (میلسیک-ترزیک و همکاران، ۲۰۰۱). لوریا و لیوید-جونس (۱۹۹۹) مجموعه‌ای از ژن‌های جدا شده از سویه RP007 *بورکهولدریا* را که در

1.Amplicons
2. Internal transcribed spacer
3. Single-strand conformation polymorphism
4. Amplified ribosomal DNA restriction analysis
5. Terminal restriction fragment length polymorphism

متابولیسم PAH درگیر بودند، بررسی کردند. آن‌ها دیدند که جایگاه[1] *phn* دارای نُه قالب خوانش باز[2] (ORF) بوده که آنزیم‌های تجزیه کننده نفتالن و فنانترن را رمز می‌کند.

تکنیک‌های مولکولی می‌توانند ابزاری سریع برای تعیین فراوانی نسبی گونه‌های معمولِ موجود در یک نمونه را بدون نیاز به کشت فراهم کنند. گِلسومینو و همکاران (۱۹۹۹) پس از انگشت‌نگاری مولکولی گسترده در انواع خاک‌های مشابه (رسی، شنی، لومی و غیره) دریافتند که خاک‌های مشابه، باکتری‌های غالبِ مشابهی نیز دارند. بنابراین روشن است که نوع خاک نه تنها بر نوع آلودگی که می‌تواند در معرض آن قرار گیرد، تاثیر دارد بلکه بر جامعه میکروبی موجود در آن هم تاثیر می‌گذارد. باندی و همکاران (۲۰۰۲) با انجام آزمایش‌های زیست‌پالایی مقایسه‌ای در انواع گوناگون خاک‌ها که همگی آلوده به دیزل بودند، دریافتند که آلودگی یکسان سبب توسعه احتمالی جامعه میکروبی مشابه در خاک‌ها نشد. آن‌ها نتیجه گرفتند که خاک‌های متفاوت پتانسیل میکروبی ذاتی متفاوتی برای تجزیه هیدروکربن‌ها دارند. روش‌های مولکولی همچنین امکان توصیف تفاوت‌های اصلی بین جوامع در آزمون فرضیه، بر اساس مقایسه نمونه‌ها را هم فراهم می‌کنند (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). اما آن‌ها معمولاً نمی‌توانند موجوداتی را که ابتدا در جریان اصلی انرژی در سامانه درگیر می‌شوند، آشکار سازند. متخصصین بوم‌شناسی میکروبی خاک می‌گویند که تنها موجودات کمی در جایگاه خاص به طور مستقیم نقش چشم‌گیر دارند (دی‌جونگه و همکاران، ۲۰۰۱). اگر این موجودات هدف آنالیزهای بدون کشت قرار گیرند، اطلاعات بیشتری را می‌توان به دست آورد. برای نمونه لِیس و همکاران (۲۰۰۵) با آغازگرهای PCR که ناحیه 16S ژنوم *مایکوباکتریوم* را هدف قرار داده بودند، *مایکوباکتریوم‌های* با رشد سریع در خاک‌های آلوده به PAH را شناسایی کردند. آن‌ها در ادامه از روش PCR-DDGE برای تشخیص بین گونه‌های مختلف و در نهایت آشکارسازی تبارشناختی گونه‌های تجزیه کننده PAH استفاده کردند.

۱۷-۱-۲- الکتروفورز ژل با شیب واسرشته کننده

ژل الکتروفورز با شیب واسرشته کننده (DGGE) مناسب‌ترین روش مولکولی برای پایش بوم‌شناسی جوامع میکروبی است. وامبرگ و همکاران (۲۰۰۳) از DGGE برای شناسایی جزء باکتریایی در جامعه رایزوسفری نخود[3] استفاده کرده و مشاهده کردند که تغییرات شیمیایی در رایزوسفر در طول رشد گیاه با تغییر در جامعه باکتریایی موجود همراه است. مک‌نافتون و همکاران (۱۹۹۹) از DGGE برای شناسایی اعضای جامعه‌ی مسئولِ زیست‌پالایی لکه آلودگی نفت خام و

1. Locus
2. Open-reading-frames
3. *Pisum sativum* L.

پایش تغییرات جامعه و کاهش سطح آلودگی با زمان استفاده کردند. روش DGGE مبتنی بر تغییر در توالی ژنتیکی ناحیه تکثیر شـده خاص برای تمایز بین گونه‌ها در جامعه میکروبی است (بَنکس و آلمان، ۲۰۰۲؛ کوایزومی و همکاران، ۲۰۰۲). فرآورده PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید که دارای شیب واسرشته کننده‌ی DNA خطی است، الکتروفورز می‌شود. الگوی نوارها روی ژل، اثر انگشت ژنتیکی کل جامعه میکروبی مورد آزمایش را ایجاد می‌کند (گیلان، ۲۰۰۴). در بیشـــتر موارد ژن‌های 16S rRNA مورد اسـتفاده قرار می‌گیرند تا همه ترکیب گونه‌ای یک نمونه را شـامل شوند. توالی جزئی این ژن برای محیط‌هایی به پیچیدگی خاک هم آنالیز شـــده اســـت (تروباک و همکاران، ۲۰۰۴). بودلیر و همکاران (۲۰۰۵) باکتری‌های اکسـید کننده متان آب شیرین نیزار را با استفاده از ترکیبی از آغـازگرهای 16S موجود نشـــان دادند. آن‌ها دیدند که PCR مســـتقیم از آغازگرهای عمومی و اختصـاصـی اگر باهم ترکیب شـوند، منجر به نیم‌رخ یکسانی از جامعه در مقایسه با استفاده از روش تکثیر آشیانه‌ای[1] می‌شود.

اگرچه آنالیز ژن 16S در حال حاضر برای جوامع وسیع بسیار کارآمد است، اما دیگر ژن‌ها را هم می‌توان برای تنوع جوامع بررسـی کرد. ژن‌های عملکردی توالی‌های متغیر بیشتری دارند و می‌توان برای تمایز در جوامعی که از نظر بوم‌شناختی متفاوت هستند ولی ارتباط نزدیک باهم دارند، از آن‌ها اسـتفاده کرد. تروباک و همکاران (۲۰۰۴) ژن‌های *nirS*، *nirK* و *nosZ* را که در دنیتریفیکاسـیون بیشـتر به عنوان نشان‌گرهای زیستی تمایزدهنده درگیر هستند، بررسی کردند. از DDGE حتی در پژوهش‌های حفاظت گیاهان شـامل آنالیز فلور گوارشـی چندین گونه حشره آفت، جوامع ساکن در رایزوسفر و سطح برگ واریته‌های مختلف گیاهی و اثر آفت‌کش‌های زیستی روی میکروفلور طبیعی استفاده شده است (اُکالاگان و همکاران، ۲۰۰۳).

۱۷-۱-۳- چندشکلی آرایش فضایی تک رشته‌ای[2]

از چندشـکلی آرایش فضـایی تک رشـته‌ای (SSCP) DNA در آنالیز و شـناسـایی جهش استفاده می‌شود. این روش شامل جداسازی فرآورده‌های PCR rDNA تک رشته‌ای با همان تعداد جفت باز اما با ســـاختار آرایش فضـــایی متفاوت روی یک ژل پلی‌اکریل‌آمید اســـت (دی‌جونگه و همکاران، ۲۰۰۱). از این تکنیـک در آنـالیز و تمـایز بین کشـــت خالص ریزجانداران خاک و جامعه میکروبی کشـت نشـده‌ی رایزوسـفر اسـتفاده شـده اسـت (شوایگر و تِبِه، ۱۹۹۸). در شرایط غیرواسرشته‌ای، DNA تک رشته‌ای پیچ خورده و آرایش فضایی ثانویه‌ای می‌گیرد که وابسته به توالی آن است. این ســـاختـار توان جـابـه جـایی الکتروفورزی متفـاوتی بـه مولکول می‌دهـد که می‌توان آن را در ژل

1. Nested amplification
2. Single-Strand Conformation Polymorphism

پلی‌اکریل‌آمید غیر واسرشته‌ای جدا کرد. از SSCP به همراه توالی‌سنج خودکار[1] DNA می‌توان در تمایز بین گونه‌ها و با استفاده از فرآورده‌های PCR ژن 16S rRNA استفاده کرد (شوایگر و تِبِه، ۱۹۹۸). محدودیت استفاده از این تکنیک در آنالیز DNA جوامع، نرخ بالای اتصال مجدد[2] پس از واسرشته شدن، به ویژه در غلظت‌های بالای DNA است. محدودیت دیگر SSCP ظهور دو نوار روی ژل الکتروفورز است که تنها به دلیل به دست آمدن فرآورده PCR دو رشته‌ای ایجاد می‌شود. به طور مشخص، سه نوار روی ژل دیده می‌شود که یکی برای فرآورده دو رشته‌ای و دو تا برای مولکول DNA تک رشته‌ای حاصل از PCR است. در برخی موارد تعداد چهار یا بیشتر از چهار نوار هم ممکن است روی ژل دیده شود که به سبب آرایش فضایی ساختاری متفاوت مانند پیچ‌خوردگی سنجاق‌سر[3]، به دلیل وجود توالی‌های پالیندرومی[4] است. همچنین آرایش فیزیکی فرآورده‌ها هم ممکن است مشابه باشد که سبب روی‌هم افتادن آن‌ها در ژل و مشاهده تعداد نوار کمتر روی ژل می‌شود. سرانجام، دورشته‌ای‌های ناهمگون DNA با توالی‌های یکسان ممکن است به هم بچسبند و تشکیل دورشته‌ای‌های ناهمگون قوی[5] دو یا چند فرآورده‌ی PCR شود (شوایگر و تِبِه، ۱۹۹۸).

۱۷-۱-۴- آنالیز DNA ریبوزومی برش خورده تکثیر شده

تکنیک دیگرِ انگشت‌نگاری DNA مبتنی بر PCR که امکان استفاده از قطعات کوتاه تکثیر شده را فراهم می‌کند آنالیز DNA ریبوزومی برش خورده تکثیر شده (ARDRA) است. این روش سبب ایجاد تعداد زیادی از نوارها در هر گونه می‌شود و بنابراین نمی‌تواند ویژگی‌های ژنوتیپی قابل اعتماد در سطح جامعه ایجاد کند (دی‌جونگه و همکاران، ۲۰۰۱). به هر حال، این روش به ویژه برای پایش جوامع و بررسی تنوع میکروبی مناسب است و با آن می‌توان روی زیرگروه‌های خاص در درون یک جامعه تمرکز کرد (دی‌جونگه و همکاران، ۲۰۰۱). لاگاسی و همکاران (۲۰۰۴) از توالی‌یابی قطعات ARDRA متعلق به 16S rRNA برای تعیین جوامع باکتریایی شیره افرا استفاده کردند. نیم‌رخ ARDRA منجر به ترسیم دندروگرامی[6] شد که نشان می‌داد روابط خویشاوندی بین سویه‌های باکتریایی و گاما-پروتئوباکترها[7] در کل سال غالب است.

---

1. Automated DNA sequencer
2. Re-annealing
3. Hairpin folding
4. Palindromic sequences
5. Breathing heteroduplexes
6. Dendogram
7. γ-proteobacteria

۱۷-۱-۵- PCR رونویسی معکوس

در PCR رونویسی معکوس (RT-PCR)، RNA به جای DNA استخراج می‌شود و نیم‌رخ ژنتیکی ریزجاندارانی که از نظر متابولیکی فعال هستند، نشان داده می‌شود (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱). این کار یک فرایند دو مرحله‌ای است. گام اول، شامل تولید DNA مکمل (cDNA) از رشته الگوی RNA پیام‌رسان (mRNA) با استفاده از dNTPs و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس[1] وابسته به RNA در ۳۷ درجه سلسیوس است. گام دوم، شامل استفاده از آنزیم رونوشت‌بردار دما پایدار و مجموعه‌ای از آغازگرهای بالادست و پایین‌دست DNA است. نوسان دمایی بین ۳۸ درصد و ۹۵ درجه سلسیوس، سبب آسان شدن پیوند ویژه‌ی آغازگرها به cDNA می شود و به آنزیم رونوشت‌بردار امکان تولید DNA دورشته‌ای را می‌دهد. پس از حدود ۳۰ چرخه، رشته RNA الگو توسط RNAse H تجزیه شده و تنها cDNA در محلول باقی می‌ماند. در حال حاضر این امکان وجود دارد که با استفاده از مهره‌های موم[2] که دارای آنزیم‌های لازم هستند و در دماهای بالاتر ذوب شده و محتوای خود را آزاد می‌کنند، این فرایند به صورت تک‌مرحله‌ای انجام شود.

تکثیر نمایی به روش RT-PCR یک تکنیک با حساسیت بسیار بالا است که می‌تواند RNAهای با تعداد رونوشت[3] بسیار کم را شناسایی کند. از این روش در شناسایی بیماری‌های ژنتیکی و تعیین کمی فراوانی مولکول‌های گوناگونِ RNA در درون یک یاخته یا بافت و به عنوان معیاری از بیان ژن مانند نورترن بلات[4] استفاده می‌شود.

۱۷-۱-۶- قطعه‌بندی مختص باز و طیف‌سنجی جرمی

قطعه‌بندی مختص باز ژن 16S rDNA تکثیر شده با PCR و به دنبال آن طیف‌سنجی جرمی الگوی قطعه برای شناسایی سریع باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود (وان وینتزینگرود و همکاران، ۲۰۰۲). این روش اساساً دقیق و سریع است و آن را به ابزاری جذاب در شناسایی پُربروندادِ میکروبی در کاربردهای دارویی و صنعتی تبدیل کرده است.

۱۷-۱-۷- آنالیز نشان‌گرهای زیستی لیپیدی معرف/ کاوشگرهای اسید نوکلئیک محیطی[5]

از نشان‌گرهای زیستی معرف لیپید می‌توان در پایش تغییرات زیست توده استفاده کرد. آنالیز نشان‌گرهای زیستی معرف لیپید/ کاوشگرهای اسید نوکلئیک محیطی (SLB/ENAP)، تکنیک‌های

1. Reverse transcriptase
2. Wax beads
3. Copy number
4. Northern blot
5. Signature Lipid Biomarker Analysis/Environmental Nucleic Acid Probes

انگشـــت‌نگاری مولکولی نســـبتاً ارزانی هســـتند که برای تعیین کمی دقیق توده میکروبی[1] به کار می‌روند. اســتخراج شیمیایی اسیدهای چرب فسفولیپیدی از خاک می‌تواند در تعیین تنوع در درون خاک و برآورد زیســت توده میکروبی مفید باشــد (بنکس و آلِمَن، ۲۰۰۲). این روش تعیین می‌کند که چه زمانی یک جامعه بوم‌شــناختی، مانند جامعه‌ای معروف یا شــناخته شــده که به نظر ســالم می‌رســد، خواهد شــد (در واقع زمان تغییر جوامع به سـمت جامعه سالم را تعیین می‌کند) (وایت و همکاران، ۱۹۹۸). کُل اســیدهای چرب فســفولیپیدی (PLFA ها) در یاخته ذخیره نمی‌شــوند. بنابراین بازگشــتی ســریع در جوامع دارند. این فسفولیپیدها نشان‌گرهای ایده‌آلی برای پایش زیست توده‌ای هســتند که در جامعه دیده می‌شــوند. زیرا افزایش در نســبت ســیس/ترانس مونوانیک PLFAها[2] در یاخته، شـاخصـی از تنش‌های سمی در جوامع باکتریایی است و بنابراین سبب تغییر در فاز رشــدی آن‌ها می‌شــود (اســتیفن و همکاران، ۱۹۹۹). از نشــان‌گرهای زیســتی ویژه PLFA می‌توان برای تعیین تنوع در جوامع میکروبی گســترده شــامل بـاکتری‌هـا، قـارچ‌هـا، جلبـک‌ها، بـاکتری‌هـای گرم-منفی و گرم-مثبت، *اســفینگومونادها*[3]، اکتینومایســت‌ها و باکتری‌های کاهنده ســولفات استفاده کرد. روش PLFA در آنالیز جوامع باکتری‌های گرم-منفی دچار محدودیت است. در نیم‌رخ آنالیز این جوامع، اسـیدهای چرب مونوانوئیکِ اشـباع و سـیکلوپروپان که توزیع گسـترده دارند، غالب هسـتند و بنابراین برای توصیف ساختار جمعیتی گرم-منفی‌ها اطلاعات مفید زیادی به دســت نمی‌دهند. این روش با آنالیزهای مبتنی بر اســید نوکلئیک مانند DGGE ترکیب شــده تا امکان توصیف بهتر جوامع را فراهم کند (استیفن و همکاران، ۱۹۹۹).

۱۷-۱-۸- چندشکلی در طول برش‌های محدودالاثر انتهایی

چندشـکلی در طول قطعات محدودالاثر انتهایی (T-RFLP) روش مسـتقل از کشتی است که برای به دسـت آوردن انگشت‌نگاری ژنتیکی جوامع میکروبی به کار می‌رود و نشان داده شده است که در تمـایز بین جوامع میکروبی در محیط‌هـای گونـاگون کـارآیی دارد (بلـک‌وود و همکـاران، ۲۰۰۳). خودکار بودن این روش عملکرد نمونه را افزایش می‌دهد و آنالیز جوامع باکتریایی را شتاب می‌بخشد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). از فرآورده‌های PCR شــده 16S rDNA در این روش اســتفاده می‌شــود (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱). یک انتهای فرآورده PCR با آغازگر حامل رنگ فلورســنت نشــان‌دار می‌شود. سپس آن قطعه توسط آنزیم برش‌دهنده جدا می‌شود تا قطعه انتهایی محدودالاثر[4] (T-RF

1. Microcosm
2. Cis/trans monoenic PLFAs
3. Sphingomonads
4. Terminal restriction fragments

ها) را ایجاد کند که با الکتروفورز روی ژل جدا می‌شود و با برانگیختگی رنگ فلورسنت دیده خواهد شد (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱؛ بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). در الگوی نوارهای به دست آمده، هر نوار برای یک گونه یا ریبوتیپ[1] است (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱). این کار داده کمی را روی هرکدام از T-RFها فراهم می‌کند که شامل اندازه جفت بازها و شدت نور فلورسنت (ارتفاع اوج‌ها) است (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳). سپس اندازه T-RFها را می‌توان با پایگاه داده‌ای نظری به دست آمده از اطلاعات توالی‌ها مقایسه کرد (بلک‌وود و همکاران، ۲۰۰۳)، که غنای گونه‌ها و همین‌طور ساختار جامعه زیست‌بوم را ارائه می‌کند (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱).

۱۷-۱-۹- سایر تکنیک‌ها

یک روش برای شناسایی DNA برون‌یاخته‌ای در نمونه‌های محیطی توسط انگلند و همکاران (۲۰۰۴) ارائه شده است. در این روش برای تخریب غشای یاخته از مواد شیمیایی سخت استفاده نشده یا تخریب فیزیکی کل یاخته‌ها در نمونه انجام نمی‌شود. انگلند و همکاران (۲۰۰۴) فرض کردند که ماندگاری DNA برون‌یاخته‌ای در محیط تا اندازه‌ای به دلیل تشکیل کمپلکس‌های DNA-خاک در محیط است که در آن DNA عریان پس از مرگ و تجزیه یاخته در محیط رها شده و ذرات خاک با چسبیدن به آن، DNA را از تجزیه شدن توسط نوکلئازها محافظت می‌کنند. DNA برون‌یاخته‌ای در محیط می‌تواند یک منبع غذایی یا یک اندوخته‌ی ژنتیکی باشد. این DNA را می‌توان با استفاده از روش عصاره‌گیری ملایم و نسبتاً سریع که شامل تهیه سوسپانسیون از ۰/۵ گرم نمونه لاش برگ در ۴ میلی‌لیتر سدیم پلی‌فسفات (pH = ۸) و تکان دادن[2] آن و سپس چند مرحله شست‌وشو و فیلتر کردن، استخراج کرد. بدین ترتیب، DNA برون‌یاخته‌ای برای استفاده آماده می‌شود.

تکنیک‌های دیگر مانند آنالیز جداکننده بین ژنی ریبوزومی (RISA)، چندشکلی در طول قطعات محدودالاثر-ITS (ITS-RFLP) و DNA چندشکلی تکثیر شده‌ی تصادفی[3] (RAPD) نیم‌رخ پیچیده‌ای از جامعه فراهم می‌کنند که برای پژوهش‌های ترکیب جوامع می‌توان آن‌ها را آنالیز کرد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). شناسایی و تفکیک آنالیز قطعات از روش‌هایی مانند آنالیز جداکننده‌ی بین ژنی ریبوزومی خودکار[4] (ARISA) و ناهمگنی طول محصولات PCR[5] (LH-

1. Ribotype
2. Shaking
3. Random amplified polymorphic DNA
4. Automated ribosomal intergenic spacer analysis
5. Length heterogeneity PCR

PCR) امکان‌پذیر اســـت (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). روش بیشـــترین تعداد احتمالی[1] (MPN) یک تکنیک غنی شـده ویژه است که از سوبستراهای در دسترس استفاده می‌کند تا شماری از جانداران که قادر به تجزیه آلاینده‌ی خاص هستند را در یک محیط شناسایی کند. (بنکس و آلِمَن، ۲۰۰۲).

روشـی که در مطالعه تنوع باکتری‌ها بیشـترین کاربرد را دارد، استفاده از کتابخانه‌های همسانه[2] ژن‌هـای 16S rRNA اســـت. ژن‌هـا از بـاکتری‌هـایی که به طور طبیعی در محیط هســـتند و با آغازگرهای عمومی 16S rRNA و به روش PCR جمع‌آوری شـده‌اند (کاترل و کیرشـمن، ۲۰۰۰). این پژوهش‌گران، جوامع میکروبی دریایی را در محل، مطالعه کرده و دریافتند که داده‌های کتابخانه همسـانه مبتنی بر PCR، گونه‌های تازه و کشت نشده‌ای را نشان می‌دهد که در اقیانوس‌های جهان پراکنده هسـتند. به هر حال، کتابخانه‌های همسـانه‌ای در هر گام از روش (شـامل جمع‌آوری نمونه، تخریب یاخته، اسـتخراج اسید نوکلئیک، تکثیر PCR و همسانه‌سازی) تحت تاثیر اُریبی قرار گرفته و ممکن اسـت از ترکیب واقعی جامعه انحراف پیدا کنند (کاترل و کیرشمن، ۲۰۰۰). با به کارگیری مخلوط‌هـای کنترل شـــده‌ی 16S DNA ریبوزومی در PCR، ممکن اســـت که فراوانی نســـبی مولکول‌هـای DNA هـدف در فرآورده نهـایی PCR تحـت تـاثیر اُریبی قرار گیرد. چنـدین مورد احتیاطی برای کاهش این گونه اُریبی‌ها در طی PCR پیشـنهاد شـده است، اما در هر صورت مقدار اُریبی در زیستگاه‌های طبیعی ناشناخته است.

۱۷-۱-۱۰- خطاهای احتمالی روش‌های مولکولی

به دلیل شـمار کمِ ریزجانداران کشـت شـده در مقایسـه با شـمار زیادِ غیرقابل‌کشـت آن‌ها، از تنوع میکروب‌ها روی محیط کشت نمی‌توان به تنوع میکروبی رسید. بنابراین تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR برای شناخت بهتر جوامع میکروبی در نمونه‌های پیچیده ترجیح داده می‌شوند. به هر حال، بررســی کامل انجام شـده توسـط وان وینتزینگرود و همکاران (۱۹۹۷) نشـان داد که خطاهایی در آنالیزهای ژنومی مبتنی بر PCR وجود داردکه پژوهش‌گر می‌تواند دچار آن‌ها بشود. به طور خلاصه این پژوهش‌گران به این نتیجه رســـیدند که پس از جمع‌آوری اولیه نمونه‌ها مشـــکلاتی در تخریب یاخته‌ها، اســـتخراج DNA/RNA، PCR، جداکردن ژن‌ها و آنالیز توالی داده‌ها می‌تواند پیش بیاید. این مشکلات شامل موارد زیر است:

- اگر همـه DNA میکروبی از یـاختـه‌های نمونه رها نشـــود، تخریب ناقص یاخته می‌تواند سبب انحراف آنالیزها شود.

---

1. Most probable number
2. Clone libraries

- DNA/RNA پس از رها شـدن از یاخته‌ها در طی فرایند شست‌وشو می‌توانند به قطعاتی بشکنند که ممکن است بر گام‌های پس از استخراج تاثیر داشته باشد.
- موادی مانند اسـیدهای هیومیک که با اسـیدهای نوکلئیک از خاک اسـتخراج می‌شـوند، می‌تواننـد در PCR اختلال ایجـاد کننـد و جلوی واکنش آنزیم با رشـــته الگو را بگیرند. کارایی تکثیر بین مولکول‌ها باید یکسان باشد. بنابراین فرض‌های زیر باید برقرار باشند:

۱) همـه مولکول‌هـا امکان دســترســی برابر جهت هیبریداســیون با آغازگر دارند و هیبریدهای آغازگر-الگو با کارایی یکسان ایجاد می‌شوند.

۲) کارایی طویل شدن که توسط DNA پلیمراز[1] انجام می‌شود در همه رشته‌های الگو یکسان است.

۳) کاهش یا فرســودگی اجزای واکنش بر همه رشــته‌های الگو به طور یکســان اثر می‌گذارد.

افزون بر این، تشـکیل محصـولات جانبی PCR هم ممکن است به دلیل ایجاد کایمرها[2] بین دو مولکول هومولوگ، جهش‌های حذف شده[3] در اثر ساختارهای ثانویه پایدار و جهش‌های نقطه‌ای[4] به دلیل جای‌گیری نادرســت بازها توســط DNA پلیمراز، رخ دهد. افزون بر این‌ها، امکان آلودگی به دلیل ورود DNA خارجی به واکنش ناشـی از خطای آزمایشـی را هم باید در نظر داشت که با قرار دادن کنترل منفی بدون DNA الگو در آزمایش، می‌توان آن را پایش کرد.

آنالیز توالی 16S rDNA معمولا با مقایســه توالی‌های از پیش شــناخته شــده که در پایگاه داده‌های جهانی موجود است، انجام می‌شود. به هر حال اگر توالی‌های محیطی، موجود تازه یا کشت نشـده‌ای را نشـان دهند، یا آن‌ها را نتوان به هیچ گروهی در طبقه‌بندی الحاق کرد، باید شناسایی و تعیین شـوند. بیشـترِ توالی‌های پایگاه داده‌ای به دلیل طول آن‌ها (نیمه کاره یا جزئی بودن) یا ابهام رده‌بنـدی کیفیت پایینی دارند (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴). برای جلوگیری از خطاهای احتمالی در آنـالیز مولکولی نمونه‌ها، وان وینتزینگرود و همکاران (۱۹۹۷) پیشـــنهاد کردند که نتایج روش‌های مختلف اسـتخراج، تکنیک‌های PCR و همسانه‌سازی به صورت هم‌زمان بررسی شوند تا دقیق‌ترین نتیجه ممکن به دست آید.

---

1. DNA polymerase
2. Chimeras
3. Deletion mutants
4. Point mutants

۱۷-۲- تکنیک DGGE و کاربردهای آن

مویزر و همکاران (۱۹۹۳) DGGE را به عنوان یک تکنیک جدید انگشت‌نگاری ژنتیکی معرفی کردند. معمولاً این روش به دلیل آشکارسازی سریع تغییرات جامعه در یک نمونه، ترجیح داده می‌شود (اندرسون و همکاران، ۲۰۰۳). سپس نوارها را می‌توان برش داده و توالی‌یابی کرد. از تغییرات توالی rRNA برای روشن کردن روابط تبارشناختی بین موجودات و طراحی کاوش‌گرها برای شناسایی رده‌های میکروبی استفاده شده است (مویزر و همکاران، ۱۹۹۳). از DGGE برای تعیین تنوع ژنتیکی میکروبی و به ویژه جوامع غالب در یک نمونه استفاده شده است (مویزر، ۱۹۹۹؛ کوکلین و همکاران، ۲۰۰۱؛ استامپر و همکاران، ۲۰۰۳). جینز و همکاران (۲۰۰۳) به این نتیجه رسیدند که از این روش می‌توان برای تعیین خلوص و یکنواختی[1] سویه‌های جدا شده از هم استفاده کرد.

از ژل‌های واسرشته‌کننده شیب‌دار برای تعیین چند شکلی در قطعاتی غیر از RFLP استفاده شده است (هلمس، ۱۹۹۰). قطعات دورشته‌ای (۲۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز) و محصولات PCR ژن‌های rRNA (rDNA) با همان طول اما توالی متفاوت جفت باز، روی ژل شیب‌دار واسرشته‌کننده جداسازی شده‌اند (فریس و همکاران، ۱۹۹۶؛ ناکاتسو و همکاران، ۲۰۰۰؛ دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱؛ کاوایی و همکاران، ۲۰۰۲). به نظر می‌رسد اگر چنانچه بتوان DNA را از موجود هدف به طور اختصاصی تکثیر کرده، یا ناهمگنی کافی برای تمایز خوب روی ژل داشته و یا بخشی از ژنی باشد که در آن زمان داده‌های وسیعی از توالی‌های آن در پایگاه‌های اطلاعاتی در دسترس باشد در این‌صورت تنها بخشی از DNA نیز برای آنالیز DGGE مناسب خواهد بود (جینز و همکاران، ۲۰۰۳).

عاملی که کارایی DGGE را کاهش می‌دهد، طراحی آغازگر است. برای موفقیت در آنالیز، توالی‌های هدف نباید منجر به قطعاتی شوند که بیش از ۵۰۰ جفت باز داشته باشند (تروباک و همکاران، ۲۰۰۴). در حال حاضر، توالی 16S rDNA مربوط به بزرگ‌ترین مجموعه داده‌ی اختصاصی ژن که هر روز در حال افزایش است، روی مجموعه داده‌های قابل دسترس بین‌المللی (بیش از ۳۰۰۰۰) موجود بوده و شناسایی آزمایشی باکتری‌های ناشناخته را امکان‌پذیر می‌کند (وان وینتزینگرود و همکاران، ۲۰۰۲). اُوِراس و همکاران (۱۹۹۷) اولین کسانی بودند که rDNA آرکئا را با DGGE آنالیز کردند. با استفاده از مجموعه آغازگرهای اختصاصی، در نمونه‌های گرفته شده از دریاچه دارای لایه‌بندی[2] (دریاچه‌ای که آب آن در فصول سال مخلوط نمی‌شود) در نروژ، مشاهده کردند که با افزایش عمق، آرکئاها افزایش و باکتری‌ها کاهش پیدا می‌کنند.

---

1. Uniqueness
2. Meromictic

فرآورده‌های DNA دورشته‌ای که از راه DGGE الکتروفورز می‌شوند، اگر به یک رشته شکسته شوند به دلیل افزایش خطی شیب واسرشته‌کننده روی ژل، می‌ایستند (مویزر و همکاران، ۱۹۹۳؛ کورتیس و کراین، ۱۹۹۸). واسرشته‌کننده‌هایی که استفاده می‌شوند، معمولاً گرما (۶۰ درجه سلسیوس ثابت)، فرمامید (۰ تا ۴۰ درصد) و اوره (۰ تا ۷ مولار) هستند (هلمس، ۱۹۹۰). در آغاز قطعات بر اساس نسبت جرم مولکولی حرکت می‌کنند. ولی با افزایش شیب واسرشته‌کننده، قطعات با توجه به شکستن پیوندهای هیدروژنی مارپیچ دورشته‌ای که اصطلاحاً ذوب شدن نامیده می‌شود، شروع به جدا شدن می‌کنند (هلمس، ۱۹۹۰). این ذوب شدن نسبی پیشروی مولکول DNA روی ژل را کُند می‌کند و این کُند شدن حرکت با توجه به تفاوت در توالی‌ها متفاوت خواهد بود (مویزر و همکاران، ۱۹۹۳). توالی محصول PCR تعیین می‌کند که در چه غلظتی از واسرشته‌کننده جداسازی روی ژل رخ می‌دهد (فریس و همکاران، ۱۹۹۶؛ کورتیس و کراینه، ۱۹۹۸؛ ناکاتسو و همکاران، ۲۰۰۰). با افزایش غلظت واسرشته‌کننده، DNA به طور کامل به دو رشته جدا تبدیل می‌شود (هلمس، ۱۹۹۰). جداشدن دو رشته از هم مانند زیپ اتفاق نمی‌افتد و بخش‌های خاصی از DNA در دامنه باریکی از غلظت واسرشته‌کننده ناگهان به طور کامل جدا شده و تک رشته‌ای می‌شوند (هلمس، ۱۹۹۰؛ مویزر و همکاران، ۱۹۹۳). پس از جداشدن DNA دورشته‌ای، ژل با رنگ‌های واکنش‌دهنده با DNA که در زیر نور فرابنفش درخشش فلورسنت دارند، رنگ‌آمیزی می‌شود. رنگ سایبرگُلد برای اسید نوکلئیک روی ژل[1] در این کار استفاده شد که یک رنگ سیانیدی نامتقارن با دو اوج فلورسنت است که وقتی به DNA بچسبد در ۳۰۰ و ۴۹۵ نانومتری برانگیخته می‌شود (توما و همکاران، ۱۹۹۹). اگر از ترانس ایلومینیشن[2] ۳۰۰ نانومتر و عکس سیاه و سفید پولاروید[3] استفاده شود، سایبر گُلد حساس‌تر از اتیدیوم بروماید شده، کمپلکس رنگ- اسید نوکلئیک در حدود ۷۰ درصد قوی‌تر از رنگ‌های رایج ایجاد کرده، شدت فلورسنس ۱۰۰۰۱۹۹۹ برابر داشته، و حساسیت آن با رنگ‌آمیزی نقره برابری می‌کند. در عین حال تنها به یک مرحله رنگ‌آمیزی نیاز داشته و بر پروتکل‌های مولکولی بعدی هم تاثیری ندارد (توما و همکاران، ۱۹۹۹).

با باریک کردن دامنه واسرشته‌سازی می‌توان حساسیت DGGE را افزایش داده و سریع‌تر به نتایج قابل اعتماد و قابل تکرار رسید (فرومین و همکاران، ۲۰۰۲؛ تمرمن و همکاران، ۲۰۰۳). نرخ یا شدت جابه جایی در ژل پلی‌اکریل‌آمید با شکل فیزیکی قطعات تعیین می‌شود که خود به شیب واسرشته‌کننده و توالی قطعات بستگی دارد. به طوری‌که قطعاتی که در آن‌ها جداشدن دو رشته به صورت نسبی رخ داده باشد، بسیار کندتر از آن‌هایی که هنوز دورشته‌ای هستند، حرکت می‌کنند

1. SYBR gold nucleic acid gel
2. Transillumination
3. Polaroid black and white photography

(هلمس، ۱۹۹۰).در آنالیز جوامع پیچیده میکروبی، شکل نردبانی از نوارها روی ژل ایجاد می‌شود که هرکدام از پله‌ها برای یک محصول PCR با توالی خاص است (کورتیس و کراین، ۱۹۹۸؛ فرومین و همکاران، ۲۰۰۲). این کار امکان شناسایی هم‌زمان چند توالی 16S rRNA را می‌دهد (فریس و وارد، ۱۹۹۷؛ سکیگوچی و همکاران، ۲۰۰۲). ژل‌های حاصل شده را می‌توان برای شناسایی توالی یا نوار خاص با الیگونوکلئوتیدهای تشخیص دهنده کاوش کرد یا برش داد و دوباره تکثیر کرد و توالی‌یابی کرد (فریس و همکاران، ۱۹۹۶). این تکنیک حساسیت کافی برای شناسایی اختلاف در حد یک جفت باز در توالی را دارد (هلمس، ۱۹۹۰). به هر حال، گیلان (۲۰۰۴) دریافت که تغییر در پروتکل DGGE می‌تواند سبب نتایج ضعیف‌تر شود. بنابراین این روش باید در مجموعه‌های خاص آزمایشی استانداردسازی شود. در ادامه نشان‌گرها را می‌توان از توالی گونه‌های شناخته شده ساخت و در کنار نمونه آن‌ها را هم روی ژل اجرا کرد تا همسانی نوارها در نمونه تعیین شود. تئونیسن و همکاران (۲۰۰۵) در آنالیز ریزجانداران پروبیوتیک[1] ماست و کپسول و قرص‌های لیوفیلیزه[2] شده از این روش استفاده کردند. دو نشان‌گر با فرآورده PCR *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم*[3] شناخته شده در کنار نمونه‌های آزمایشی اجرا شده و الگوی نوارها برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌ها به کار گرفته شدند. کیسِر و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایشی مشابه اما پیچیده‌تر، نشان‌گرهای پنج گونه باکتری متان‌زای[4] شناخته شده را برای تعیین نوارهای DGGE در نمونه خروجی لجن فاضلاب بیوراکتور بی‌هوازی استفاده کردند و مشاهده کردند که نمونه‌ها با نشان‌گر مطابقت نداشتند. این نوارها سپس برش خورده و توالی‌یابی شدند و یک نشان‌گر DGGE برای پایش اعضای آرکئاها بر اساس نتایج توالی‌ها در جامعه میکروبی لجن توسعه داده شد.

وضوح DGGE را می‌توان با تلفیق توالی‌های غنی از GC به یکی از آغازگرها افزایش داد. با این کار رفتار ذوب شدن قطعات تغییر کرده و این امکان به وجود می‌آید که بیشتر توالی‌ها روی ژل واسرشته کننده شناسایی شوند (فریس و همکاران، ۱۹۹۶؛ کورتیس و کراینه، ۱۹۹۸). گیره GC به انتهای '5 محصول PCR متصل شده و از ذوب کامل قطعات در طی جدا شدن آن روی ژل واسرشته کننده جلوگیری می‌کند و همین‌طور حساسیت روش را به اندازه کافی بالا می‌برد که همه تغییرات تک‌بازی را در قطعات PCR دارای ۵۰۰ جفت باز شناسایی کند (هیوئر و همکاران، ۱۹۹۷). شفیلد و همکاران (۱۹۸۹) دریافتند که اتصال گیره GC دارای ۴۰ تا ۴۵ جفت باز به آغازگرها امکان شناسایی جهش‌های تک بازی را فراهم می کند و آن را به ۱۰۰ درصد می‌رساند.

---

1. Probiotic
2. Lyophilised
3. *Bifidobacterium*
4. Methanogenic

درحالی که پیش‌تر، تنها ۴۰ درصد از آن‌ها در آنالیز DGGE قابل شناسایی بودند. افزون بر این بون و همکاران (۲۰۰۲) به این نتیجه رسیدند که گیره GC قطعات بزرگ را در واکنش‌های پایانی PCR آشیانه‌ای که برای آنالیز DGGE است، پایدار می‌کند. به هر حال، با وجود شواهدی در دفاع از تاثیر مثبت قرار دادن گیره GC در پایداری ذوب در طی آنالیز PCR-DGGE، در شرایط خاص می‌توان این گیره را نادیده گرفت. در این شرایط، یعنی اگر گیره GC اضافه نشود، توصیه می‌شود که فرآورده PCR باید حداقل دو دامین ذوب شدن داشته باشد (چانگ بیوساینس، ۲۰۰۴). وو و همکاران (۱۹۹۷) دریافتند که فرآورده‌های دارای گیره GC با منحنی ذوب مناسب، وقتی در معرض DGGE قرار گرفتند، منحنی ذوب آن‌ها کج شد. این پژوهش‌گران دریافتند که قطعات با دامین‌های ذوب بالا، بدون گیره GC نتایج DGGE بهتری داشتند و نتیجه گرفتند که اگر آنالیز ذوبِ محصول PCR، دامین‌های بالای ذوب در کمتر از ۴۰ جفت باز را نشان می‌دهد و دمای ذوب آن‌ها بیش از ۵ درجه سلسیوس اختلاف ندارد، بهتر است آنالیز DGGE بدون گیره GC در انتهای 5' انجام شود.

برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر می‌توان از نرم‌افزارهای آنالیز تصاویر ژل استفاده کرد. با استفاده از جدایه‌های کشت خالص شناخته شده به عنوان استاندارد، برای تشخیص و شناسایی مناسب نمونه‌های محیطی این کارامکان‌پذیر است. از تصاویر ژلِ آنالیز DGGE تصویر دیجیتال تهیه شده و برای شناسایی گونه‌های موجود در نمونه استفاده می‌شود. برای این کار باید DGGE نمونه در کنار گونه استاندارد شناخته شده اجرا شده باشد (تِمِرمن و همکاران، ۲۰۰۳). این تصاویر را می‌توان برای مقایسه نمونه‌هایی که در زمان‌های مختلف گرفته شده و آنالیز شده‌اند، استفاده کرد. در این صورت امکان پایش تغییرات ساختار جامعه با زمان فراهم می‌شود (ون‌هانن و همکاران، ۱۹۹۹). تنظیم دستی دقیقِ تصاویر ژل، آنالیز اولیه را تکمیل می‌کند و می‌توان برای ارتباط خطوط موازی نوارها دندوگرام ترسیم کرد (فرومین و همکاران، ۲۰۰۲؛ استامپر و همکاران، ۲۰۰۳).همچنین این نرم‌افزارها تراکم نوارها را که برای تعیین شاخص تنوع شانون موردنیاز است، محاسبه می‌کنند. هر نوار، نماینده یک گونه است و شدت یا تراکم نوارها متناسب با فراوانی گونه‌ها است (فرومین و همکاران، ۲۰۰۲؛ استامپر و همکاران، ۲۰۰۳؛ آندروئنی و همکاران، ۲۰۰۴). نوبل و همکاران (۱۹۹۹) تنوع فوتوتروف‌های اکسیژنی در جامعه میکروبی بسیار شور را تعیین کردند. تعداد نوارها در نمونه نشان‌دهنده‌ی غنای گونه‌ای بوده و فراوانی گونه‌ای یا همان «یکنواختی»[1] با شدت یا تراکم نوارها تعیین شد. محدودیت‌های DGGE شامل تحرک الکتروفورزی[2] مشابه در گونه‌های خویشاوند ژنتیکی که توالی‌های یکسان در ناحیه تکثیر دارند و نیز رفتار ذوب شدنِ مشابه

1. Evenness
2. Electrophoretic mobilities

در گونه‌های غیرخویشاوند ژنتیکی است (اسمالا و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین یک نوار روی ژل DGGE ممکن است نماینده بیش از یک گونه باشد. این امر توسط جکسون و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده شده است. آن‌ها جهش‌هایی هدایت شده در باکتری *ای. کولای* ایجاد کردند که قطعات 16S rDNA با یک تا چهار جفت باز متفاوت ایجاد کنند. حرکت روی ژل DGGE تغییر در یک جفت باز را نشان داد اما ثابت شد که تشخیص تغییرات چند بازی دشوار است. دو مورد از توالی‌های آزمایش شده که تنها در دو جفت باز با هم فرق داشتند، الگوی حرکتی یکسانی نشان دادند و وقتی که در نمونه مرکب اجرا شدند، تشخیص آن‌ها از یکدیگر امکان‌پذیر نبود. افزون بر این، والاِیس و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که در آنالیز DGGE، جداسازی قطعه ۲۰۰ جفت بازی 16S rDNA از *رایزوبیوم‌ها* و متانوتروف‌ها دشوار است که دلیل آن به ترتیب چندشکلی کم و زیاد توالی در این دو گروه از باکتری‌ها است.

در پایش نمونه‌های DGGE روش به کار رفته برای استخراج و خالص‌سازی DNA هم باید در نظر گرفته شود. نیِمی و همکاران (۲۰۰۱) پنج روش استخراج DNA و سه روش خالص‌سازی آن در نمونه‌های خاک رایزوسفری را به قصد آنالیز DGGE آزمایش کردند. آن‌ها دریافتند که هر دو روش استخراج و خالص‌سازی روی ساختار نهایی جامعه باکتریایی به دست آمده از DGGE تاثیر دارد. اُکالاهان و همکاران (۲۰۰۳) به این نتیجه رسیدند که DNA استخراج شده باید معرف و نماینده زیستگاه بوده، اُریبی در PCR باید در نظر گرفته شده (زیرا تکثیر ترجیحی در قطعات به دلیل اتصال ناکارآمد آغازگر ممکن است رخ دهد) و شناسایی گونه‌ها تنها نباید مبتنی بر توالی 16S rDNA باشد. البته با گسترش و توسعه مجموعه داده‌ها این روش هر روزه کارآمدتر می‌شود. با این حال، ابزارهایی برای تلفیق استانداردهای استخراج DNA و فرایند PCR-DGGE نیز وجود دارد. پترسون و داهلوف (۲۰۰۵) پروتکلی تحت عنوان «استانداردهای درونی در آنالیز مولکولی تنوع»[1] (ISMAD) ارائه کردند که می‌تواند تغییرات آزمایشی را پایش کرده و آن‌ها را در نظر بگیرد. یک محصول PCR فلورسنت دارای ۵۱۰ جفت باز در هر نمونه و پیش از استخراج DNA قرار می‌گیرد و در ادامه بازیابی می‌شود. برای پایش PCR، آغازگر غیر رقابتی که بخش ۱۴۰ جفت بازی DNA مگس سرکه[2] را کد می‌کند، به همان PCR نمونه اضافه شد. در کنار این‌ها، کنترل درونی تغییرات بین تکرار در نمونه‌ها را در طول آنالیز DGGE کاهش داد. با وجود این نقص‌های کم، برای آنالیز هم‌زمانِ چند نمونه و تهیه نقشه تغییرات جامعه در طول زمان، روش DGGE هنوز هم قابل اعتماد، تکرارپذیر، سریع و نسبتاً کم هزینه است (مویزر، ۱۹۹۹؛ فرومین و همکاران، ۲۰۰۲).

---

1. Internal Standards in Molecular Analysis of Diversity
2. *Drosophila melanogaster*

۱۷-۲-۱- آنالیز تنوع جامعه

بیشتر شاخص‌های تنوع میکروبی بر اساس مدل‌های به کار رفته درباره‌ی جانوران و گیاهان مانند شاخص‌های شانون و سیمپسون[1] است. به همین علت در کاربرد این شاخص‌ها برای مدل‌های میکروبی مشکلاتی وجود دارد. زیرا آن‌ها نیاز به تعریف دقیق از گونه‌ها و شناسایی دقیق افراد دارند. این سطح از شناسایی در باکتری‌شناسی دشوار است. یک شاخص ایده‌آل باکتریایی باید موارد زیر را در بر داشته باشد (واتوِ و گنگال، ۱۹۹۶):

- سه بُعد مهم تنوع یعنی؛ تنوع گونه‌ای، نسبت غنای گونه‌ای به فراوانی و فاصله رده‌بندی بین بیوتیپ‌ها را داشته باشد.
- مبتنی بر پارامترهای موجه آماری باشد.
- به خطاهای احتمالی و تغییرات نتایج آزمایشی حساس نباشد.
- حساسیت زیادی به اندازه نمونه نداشته باشد.

بر این اساس استفاده از مدل لگاریتمی شانون برای محاسبه تنوع میکروبی براساس انگشت‌نگاری ژل DGGE قابل پذیرش است. معیارهایی مانند تنوع و نسبت غنای گونه‌ای به فراوانی می‌تواند به ترتیب از تعداد نوارها و شدت و تراکم آن‌ها روی ژل به دست آید. توالی‌یابی هر نوار روی ژل می‌تواند بر فاصله رده‌بندی بین بیوتیپ‌ها دلالت داشته باشد. تنوع در 16S rDNA از نظر آماری به خوبی مستند شده و خطاهای احتمالی و تغییرات را در ناحیه‌ای که می‌تواند با تلفیق کنترل استاندارد درونی محافظت شود در نظر می‌گیرد. از DGGE می‌توان برای بررسی یک نمونه به صورت تکی و یا تعداد زیاد نمونه‌ها به صورت هم‌زمان استفاده کرد.

DGGE امکان تعیین جامعه و همین‌طور تنوع جمعیت خاص بدون آنالیز بیشتر و بدون تعریف افراد ویژه در آن را فراهم می‌کند (مویزر، ۱۹۹۹). از DGGE همچنین برای شناسایی و تعیین هم‌زمان تغییرات در توالی چند ژن در بین چند موجود هم استفاده شده است (مویزر و همکارن، ۱۹۹۳). شناسایی اعضای جامعه را می‌توان با هیبریداسیون ژل در نواحی بسیار متغیر توالی با کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه گونه/تاکسون یا با همسانه‌سازی و توالی‌یابی انجام داد (مویزر، ۱۹۹۹). ژل می‌تواند برای آنالیز مستقیم DNA ژنومی از طریق انتقال نوارهای جدا شده به غشاهای هیبریداسیون به روش مویین یا الکترو بلات[2] و آنالیز آن‌ها با کاوش‌گرهای DNA مورد استفاده قرار گیرد (مویزر و همکاران، ۱۹۹۳). از PCR با آغازگرهای دارای گیره GC هم می‌توان برای تکثیر توالی‌هایی که مورد نظر هستند مانند 16S، و پیش از انجام DGGE، به صورت گزینشی استفاده کرد. در اصل، DGGE امکان غربال‌گری هم‌زمان تعداد بالایی از نمونه‌ها را فراهم

1. Simpson
2. Electro-blotting

می‌کند و بنابراین آنالیز در طیف گسترده‌تر را آسان می‌کند. کوالچوک و همکاران (۱۹۹۷) از DGGE برای ارزیابی تغییرات بین گونه‌های مختلف قارچ‌های بیماری‌زا در تاکسون‌هایی که به ریشه *آموفیلا آرِناریا*[1] (علف مرام[2]) حمله می‌کنند، استفاده کردند. آن‌ها ناحیه ۵۶۹ جفت بازی ژن 18S rDNA را به وسیله PCR آشیانه‌ای دارای گیره GC روی PCR نهایی تکثیر کردند. با ارزیابی گیاهان وحشی آزمایشی و مزرعه‌ای، آن‌ها توانستند گونه‌های قارچی را شناسایی کرده و سطح بسیار بالایی از تنوع را در مقایسه با ارزیابی‌های مبتنی بر کشت قارچ‌ها تعیین کنند.

۱۷-۲-۲- مطالعات پویایی جوامع

به دلیل توانایی در غربال‌گری چند نمونه، DGGE امکان پایشِ پویایی جوامع میکروبی را که تحت نوسانات فصلی و محیطی در زیستگاهشان قرار می‌گیرند، فراهم می‌کند (مویزر، ۱۹۹۹). وارد و همکاران (۱۹۹۸) از قطعات 16S rDNA در DGGE برای مطالعه تغییرات فصلی در جوامع میکروبی در یک چشمه آب گرم استفاده کردند. در ادامه از PCR-DGGE برای پایش تغییرات فصلی در جوامع باکتریوپلانکتون‌ها[3]، رایزوسفر گل داوودی[4]، جوامع باکتریایی تخریب شده توسط ویروس‌ها و رفتار روزانه باکتری‌های احیاکننده ی سولفات و تجزیه کننده‌ی فنول در لجن فعال و همین‌طور تاثیر آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها بر جامعه میکروبی استفاده شد (مویزر، ۱۹۹۹). از DGGE حتی برای تعیین نقشه جوامع باکتریایی که از لجن/فاضلاب آلی به عنوان سوخت استفاده می‌کنند و حتی برای جامعه زیستی درون الکترود یاخته که متفاوت از لجن است، استفاده شده است.

۱۷-۲-۳- نقشه‌برداری جامعه مولکولی در محیط‌های متغیر

کشت‌های میکروبی برای آگاهی از فیزیولوژی و عملکرد میکروب‌های جداشده از محیط‌های طبیعی‌شان مهم هستند. به هر حال، ابزارهای مولکولی می‌توانند برای پایش محیط‌های غنی‌شده و آسان کردن جداسازی جوامع هدف از محیط به کار روند (مویزر، ۱۹۹۹). اسمالا و همکاران (۱۹۹۸) از DGGE و TGGE (الکتروفورز ژل واسرشته‌کننده با گرما) در آنالیز الگوی استفاده از سوبسترای BIOLOG در دو جامعه باکتریایی به دست آمده از رایزوسفر سیب‌زمینی و لجن فعال استفاده کردند. هر دو روش نشان دادند که در خروجی BIOLOG برخی از جوامع باکتریایی خاص

---

1. *Ammophila arenaria* L.
2. Marram grass
3. Bacterioplankton
4. Chrysanthemum

حضـور ندارند. جوامع پروکاریوت‌ها تنها گروهی نیسـتند که نقشـه‌برداری شده‌اند. فوچر و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از PCR-DGGE برای 18S rDNA تنوع نماتدها در نمونه‌های خاک را تعیین کرده و رابطـه معنی‌داری بین برآوردهـای DGGE و مورفولوژی غنـای گونه‌ای یافتند. مارشـــال و همکاران (۲۰۰۳) آغازگرهای PCR-DGGE را برای قارچ‌های کمپوســـت آزمایش کردند و به یک آغازگر فاکتور طویل‌سـازی آلفا[1] رسـیدند که بخشی از18S rDNA را که برای تکثیر جامعه قارچی بهینه بود، هدف قرار می‌داد. مشـــابه چنین کاری را زوکارو و همکاران (۲۰۰۳) با اســـتفاده از چهار مجموعه از آغازگرهای 18S در آنالیز DGGE برای شناسایی آسکومایست‌های[2] همیار با جلبک در گل سنگ‌ها روی سرخس‌ها انجام دادند.

۱۷-۲-۴- تمایز نیچ

بومی‌شـــناســـی میکروبی مولکولی در حال تخصـــصـــی شـــدن بیشـــتر اســـت که امکان آنالیز جوامع عملکردی خـاص در درون جوامع را فراهم می‌کند. امروزه ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم هدف مطالعات بوم‌شـــناختی هســـتند. آن‌ها می‌توانند سـطح بالایی از تغییر در توالی‌ها در مقایســـه با ژن‌های 16S rDNA را ارائه دهند که آن‌ها را به نشـــان‌گرهای مولکولی کارآمد در جوامعی تبدیل می‌کند که از نظر تبارشناختی شباهت داشته اما از نظر بوم‌شناختی متمایز هستند (مویزر، ۱۹۹۹). افزون بر این، هـدف قرار دادن ژن‌هـای عملکردی، مطالعه فعالیت‌های خاص در درون جوامع میکروبی را آســـان می‌کنند. میلسیک-ترزیک و همکاران (۲۰۰۱) از ژن‌های میکروبی درگیر در تجزیه آلاینده‌های آلی در راســتای کاربرد تکنیک‌های مولکولی در بوم‌شناسی میکروبی نواحی آلوده استفاده کردند. با زیاد شـــدن توالی ژن‌هـای عملکردی قابل دســـترس در مجموعه داده‌های جهانی، بدون تردید PCR-DGGE اطلاعات قابل توجه بیشـــتری در راســـتای ســـاختار و عملکرد جامعه با خود همراه خواهد کرد.

۱۷-۲-۵- تعیین تنوع گونه‌ای

الگوی نوارها روی ژل DGGE اگر با اسـتفاده از یک نرم‌افزار آنالیز تصاویر ژل مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد، شـاخصی از تنوع گونه‌ای فراهم می‌آورد. نورلند، (۲۰۰۴) برای آنالیز تصاویر ژل DGGE از برنامه Gel2K استفاده کرده و انگشت‌نگاری را به روش بررسی کلاستر و با استفاده از CLUST آنالیز کرد.

---

1. α-elongation factor primer
2. Ascomycetes

نوارهـای بریده شـــده از ژل DGGE می‌توانند توالی‌یابی شـــوند. ســـپس توالی‌ها برای آنالیز تبارشـناسـی مقایسه‌ای برای تعیین روابط تکاملی بین موجودات در جامعه‌ای که آنالیز در آن انجام شـــده به کار می‌روند. اندرســـون و همکاران (۲۰۰۳) جامعه قارچی خاک را با DGGE ناحیه ITS (ITS1-F با گیره GC و ITS2 منجر به قطعات ۳۰۰ جفت باز) بررســـی کرده، نوارها را توالی‌یابی کرده و نتایج تبارشـناسی توالی‌ها را BLAST کردند. تبارشناسی معیاری از تنوع گونه‌ای (نه غنای گونه‌ای) است. زیرا تنها یک نوار برای هر نمونه در ژل ایجاد شده و از آن برداشته می‌شود (ون‌هانن و همکاران، ۱۹۹۹). با تعیین خویشـاوندان نزدیک موجودات ناشـناخته، ویژگی‌های مشـخصـی را می‌توان بـه همه آن‌ها ارجاع داد (یوئدا و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین می‌توان داده‌های توالی‌یابی را در طراحی آغازگرها و کاوشگرها برای شناسایی در محل موجود مورد نظر به کار برد.

۱۷-۳- جایگزین‌های آنالیزهای مبتنی بر PCR

اسـتفاده از میکروسـکوپ و شـمارش روی پلیت روش‌های رایجی هسـتند که سریع و کم‌هزینه نیز هسـتند. کشـت گزینشـی و شمارش مستقیم با چشم می‌تواند برای فراهم کردن اطلاعات درباره‌ی بخش هتروتروف فعال جامعه به کار رود (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴). روش‌هایی در دسترس هستند که روی ویژگی‌های فیزیولوژیک/متابولیک جوامع میکروبی مانند نیم‌رخ استرهای متیله اسید چرب[1] (FAME) و آنالیز اســـیدهای چرب فســـفولیپیدی تمرکز می‌کنند (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). روش هیبریداســـیون فلورســـنت درجا (FISH) از الیگونوکلئوتیدهای فلورســـنت برای توالی‌های rRNA هدف اســـتفاده می‌کند (دی‌یانگه و همکاران، ۲۰۰۱). روش FISH را می‌توان با رنگ‌های DAPI[2] ('۴، '۶-دی‌آمیـدینو-۲-فنیـل اینـدول)، ۲-(پی-یـدوفنیل)-۳-(پی-نیتروفنیل)-۵-فنیل تترازولیوم کلراید (INT)-فورمازان[3]، یا ۵-سیانو-۲، ۳-دیتولیل تترازولیوم کلراید[4] (CTC) برای تعیین سهمی که جوامع مورد نظر در فراوانی یا فعالیت کل یاخته‌ها دارند، اسـتفاده کرد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). با این حال، FISH بازدهی پایینی داشـــته و این امر کاربرد آن در مقایســـه تعداد بالای نمونه‌ها را محدود می‌کند (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲). آزمون‌های گوناگونی هم برای شناسایی باکتری‌ها بر اساس واکنش‌هـای فیزیولوژیـک وجود دارد. از این آزمون‌هـا می‌توان بـه آزمون واکنش کـاتـالاز[5]، آزمون واکنش اکســـیـداتیو-تخمیری هاگ-لیفســـون[6]، BIOLOG و API اشـــاره کرد. API یک روش

1. Fatty acid methyl ester
2. 4',6'-diamidino-2-phenylindole
3. 2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT)-formazan
4. 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride
5. Catalase reaction test
6.Oxidative–fermentative Hugh–Leifson test

استاندارد و مینیاتوری از آزمون‌های زیست شیمیایی موجود است که ساده، سریع و قابل اعتماد بوده و به همراه روش‌های عددی شناسایی با یا بدون برنامه‌های نرم‌افزاری کامپیوتری به کار می‌رود.

۱۷-۳-۱- ریخت‌شناسی

آنالیزهای ریخت‌شناسی دقیق یاخته‌های باکتریایی می‌تواند اطلاعات مهمی درباره‌ی تنوع، فراوانی میکروبی و توزیع مکانی دوبعدی اعضای جامعه میکروبی فراهم آورد. سامانه‌های رایانه‌ای مانند CMEIAS (مرکز سامانه آنالیز تصاویر بوم‌شناسی میکروبی[1]) یک ابزار آنالیز نیمه خودکار هستند که از تکنیک‌های شناخت آرایش (با میکروسکوپ) و پردازش برای جمع‌آوری اطلاعات درباره‌ی اندازه و شکل تصاویر دیجیتال موجودات و گروه‌بندی آن‌ها به مورفوتیپ‌ها[2] استفاده می‌کنند (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲).

۱۷-۳-۲- واکنش کاتالاز

آزمون کاتالاز آزمونی برای تولید آنزیم کاتالاز توسط گونه‌های باکتریایی است. پراکسید هیدروژن فرآورده فرعی مضری است که از این فرایند متابولیکی ایجاد شده و کاتالاز آن را به آب و اکسیژن می‌شکند. این آنزیم یکی از بالاترین نرخ بازگشت‌ها را دارد. زیرا یک مولکول کاتالاز می‌تواند در هر ثانیه ۸۳۰۰۰ مولکول پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند (ویکی‌پدیا، ۲۰۰۷). اگرچه آزمون کاتالاز به تنهایی نمی‌تواند باکتری‌ها را شناسایی کند، اما ترکیب آن با سایر آزمون‌ها می‌تواند در شناسایی باکتری‌ها کمک کند (کریگ و همکاران، ۱۹۸۴). این آزمون با برداشتن یاخته‌های باکتریایی از کشت خالص در آگار، با استفاده از خلال دندان چوبی و گذاشتن آن روی لام میکروسکوپی تمیز انجام می‌شود. سپس یک یا دو قطره پراکسید هیدروژن ۳ درصد به باکتری‌ها افزوده می‌شود. تشکیل حباب‌ها در یک دقیقه به معنای پاسخ مثبت واکنش است.

۱۷-۳-۳- باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی

ماهیت تخمیری یا اکسیداتیو بودن باکتری‌ها با آزمون هاگ-لیفسون تعیین می‌شود (هاگ و لیفسون، ۱۹۵۳). کلنی‌هایی از کشت خالص روی پلیت‌های آگار در دو تکرار به صورت عمقی در لوله‌های آزمایش سترون دارای محیط پایه اکسیداتیو تخمیری[3] (OFBM) همراه با گلوکز مایه‌زنی می‌شود. محیط کشت یکی از لوله‌ها با یک سانتی‌متر پارافین مایع سترون پوشیده می‌شود. لوله‌ها

1. Centre for Microbial Ecology Image Analysis System
2. Morphotypes
3. Oxidative fermentative base medium

در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون می‌شوند. تغییر رنگ از سبز به زرد به معنی مثبت بودن نتیجه آزمایش است. اگر در هر دو لوله رنگ از سبز به زرد تغییر کند، باکتری‌ها تخمیری هستند و اگر تنها در لوله بدون پارافین رنگ تغییر کند، باکتری‌ها اکسیداتیو هستند.

۱۷-۳-۴- شناسایی با استفاده از API و Biolog

API یک مجموعه از آزمون‌های متابولیک مینیاتوری است که در شناسایی گونه‌های باکتریایی نقش مهمی دارد. جدایه‌های خالص از پتری‌های آگار روی محیط آگار تازه به مدت ۴۸ ساعت بازکشت می‌شوند. سپس از یک لوپ مایه‌زنی سترون برای تهیه سوسپانسیون یاخته‌ها در لوله‌های آزمایش دارای ۰/۸۵ درصد NaCl استفاده می‌شود. نوارهای API با این سوسپانسیون و طبق دستورالعمل سازنده آن (OMNIMED) با این لوله‌ها بارگذاری می‌شوند. چندین آزمون مختلف مانند API 50CH، API 20NE، API 20E و غیره بر اساس ویژگی‌های متفاوت گونه‌های باکتریایی در دسترس هستند.

گارلند و میلز (۱۹۹۱) تکنیکی برای بررسی پتانسیل تنوع عملکردی جوامع باکتریایی از طریق الگوی متابولیک نوع استفاده از منبع کربن[1] (SSCU) ارائه دادند. از این سامانه پلیت‌های Biolog گرم-منفی و گرم-مثبت بیرون آمد که دارای ۹۵ منبع گوناگون کربن و یک شاهد برای شناسایی متابولیکی باکتری‌ها بود (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴). پلیت‌های بوم‌شناختی Biolog (Biolog EcoPlate) به طور تخصصی برای مطالعات بوم‌شناختی و جوامع میکروبی طراحی شده‌اند. توسعه آن‌ها ابتدا از آنجا شکل گرفت که میکروپلیت‌های Biolog GN با انواعی از میکروب‌ها در محیط کشت مایه‌زنی شده و ویژگی‌های انگشت‌نگاری جامعه در طول زمان اندازه‌گیری شد. این روش که اصطلاحاً تهیه نیم‌رخ فیزیولوژیکی در سطح جامعه[2] نامیده می‌شود، در شناسایی تغییرات زمانی و مکانی جامعه میکروبی موثر است. ثابت شده است که این پلیت‌ها در ارزیابی جامعه نرمال و شناسایی تغییرات مبتنی بر یک متغیر وارد شده به جامعه مفید است. این مطالعات در جوامعی از خاک، فاضلاب، لجن فعال، کمپوست و فاضلاب صنعتی انجام شده است. Biolog EcoPlate دارای ۳۱ منبع کربن پُراستفاده برای آنالیز جامعه خاک است. در پردازش داده‌ها، هر کدام از پلیت‌ها در سه تکرار استفاده می‌شوند. جوامعی از موجودات سبب الگوی واکنش مشخص یا «انگشت‌نگاری متابولیک»[3] می‌شوند. این الگوها را می‌توان با نرم‌افزارهای رایانه‌ای در فواصل زمانی دو تا پنج روز از نظر آماری آنالیز کرده و داده‌هایی درباره‌ی تغییر جوامع میکروبی با زمان به دست آورد. این روش

1. Sole carbon utilisation
2. Community-level physiological profiling
3. Metabolic fingerprint

همچنین با دیگر روش‌ها مانند PLFA مقایسه شده و ثابت شده است که به فاکتورهایی مانند دما و آب حساس‌تر است.

۱۷-۳-۵- الحاق دوباره دو رشته DNA [1]

یک تکنیک مولکولی بدون نیاز به PCR هم ارائه شده که مبتنی بر ذوب DNA و اندازه‌گیری الحاق دو رشته آن به هم است. شیمی مقایسه‌ای ژنوم بین گونه‌ها معیاری از تنوع گونه‌ای در الحاق دوباره DNA-DNA و DNA-RNA است (ساندرسون، ۱۹۷۶). DNA خالص شده به قطعاتی شکسته شده و با حرارت واسرشته می‌شود به طوری‌که رشته مارپیچ دوگانه، جدا شده یا ذوب می‌شوند و با سرد کردن آهسته، دوباره دو رشته‌ای مکمل تشکیل می‌شود. پس از این، سرعت الحاق دوباره مارپیچ دوگانه با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود (کورتیس و سالن، ۲۰۰۵). این سرعت تحت تاثیر اندازه و پیچیدگی DNA است. به طوری‌که DNA درشت و پیچیده کم‌ترین سرعت چسبیدن دوباره را دارد. در اصل از این روش برای برآورد اندازه و پیچیدگی ژنوم موجودات به طور انفرادی استفاده می‌شود. با این حال، تورسویک و همکاران (۱۹۹۰a) چنین ذکر کرده‌اند که اندوخته DNA ژنومی حاصل از جامعه میکروبی می‌تواند در ذوب و چسبیدن دوباره، مشابه یک DNA ژنومی بزرگ عمل کند. آن‌ها DNA کل خاک را در دستگاه برش فشاری گذاشتند تا قطعاتی با میانگین جرم مولکولی ۴۲۰۰۰۰ دالتون ایجاد کنند. سپس فرض شد که ناهمگنی DNA شاخصی از تنوع ژنتیکی باکتری‌ها در خاک است. در واقع آن‌ها نشان دادند که DNA استخراج شده از خاک با سرعت بسیار کندی دوباره به هم می‌چسبد که گویی ژنومی با اندازه‌ی ۷۰۰۰ برابر بزرگتر از ژنوم یک باکتری است (کورتیس و سالون، ۲۰۰۵). بنابراین چنین استنتاج شد که نمونه خاک آنالیز شده حداقل ۷۰۰۰ گروه پروکاریوت متفاوت داشته باشد.

چسبیدن دوباره DNA تک رشته‌ای همولوگ از کینتیک واکنش درجه دوم پیروی می‌کند (تورسویک و همکاران، ۱۹۹۰a). DNA دو رشته‌ای تشکیل شده تابعی از غلظت اولیه نوکلئوتید برحسب مول در لیتر (C_0t) و زمان بر حسب ثانیه است. غلظت نیمه اشباع، $C_0t_{1/2}$ در شرایط خاص تابعی از پیچیدگی یا اندازه ژنوم DNA است. پیچیدگی به صورت تعداد نوکلئوتیدها در ژنوم یاخته هاپلوئید به غیر از DNA تکراری آن تعریف می‌شود. بر این اساس، $C_0t_{1/2}$ می‌تواند شاخص تنوع جوامع باکتریایی باشد که معادل شاخص‌هایی مبتنی بر آنالیز فنوتیپی یا تنوع گونه‌ای است.

از تکنیک الحاق دوباره DNA، در ترکیب با دیگر تکنیک‌های مولکولی مانند DGGE استفاده شده تا ایده کامل‌تری از تنوع باکتریایی در یک جامعه خاص ارائه شود. تورسویک و همکاران

1. DNA Reassociation

(۱۹۹۸) ساختار جامعه در محیطی که به صورت طبیعی آلوده شده و محیطی را که توسط کشاورزی دستخوش تغییر شده است، بررسی کردند. آن‌ها آنالیز تنوع DGGE ژن‌های rRNA را با الحاق دوباره کل DNA مقایسه کردند تا تناسبی از دو تکنیک بررسی تنوع جامعه داشته باشند. مطالعه آن‌ها نشان داد که تنوع میکروبی کل خاک ۲۰۰ برابر بیشتر از تنوع جدایه باکتریایی از همان نمونه‌ها بوده و کشاورزی و آلودگی نقشی مهم در کاهش تنوع باکتریایی داشته است.

۱۷-۴- استفاده از توالی 16S rDNA برای آنالیز صرفه‌جویی و فاصله

نواحی خاصی از توالی‌های rDNA در همه موجودات بالاترین میزان حفاظت‌شدگی را دارد در حالی‌که سایر نواحی ممکن است تغییراتی داشته باشند. تغییرات در این نواحی به طور نسبی با افزایش فاصله تکاملی بین موجودات افزایش می‌یابد و امکان تعیین روابط تبارشناختی بین ریزجانداران را فراهم می‌کند (ناکاتسو و همکاران، ۲۰۰۰). ژن‌های 16S rRNA به دلیل مفید بودن به عنوان نشان‌گر در مطالعات تبارشناسی، مهم‌ترین هدف بررسی‌های بوم‌شناسی مولکولی پروکاریوت‌ها هستند (آسبورنه و همکاران، ۲۰۰۵).

از مولکول‌های RNA ریبوزومی (rRNA) به عنوان زمان‌سنج‌های مولکولی استفاده شده است. زیرا دارای بالاترین میزان حفاظت‌شدگی ساختاری و عملکردی هستند. در نتیجه، دامین‌هایی در مولکول rRNA هستند که نرخ‌های مستقلی از تغییر توالی را با خود حمل می‌کنند. با بررسی این تغییرات در طول زمان، می‌توان روابط تبارشناسی را تعیین کرد (کنت و تریپلت، ۲۰۰۲).

در پایگاه‌های داده‌های جهانی تعداد زیادی از ژن‌ها برای مطالعات تبارشناختی در دسترس هستند. توالی‌های انتخاب شده بایستی مناسب و شرایط زیر را داشته باشند:

- نواحی ساختاری در زیرواحد کوچک و بزرگ ژن‌های rRNA با شدت‌های متفاوت تکامل یافته باشند.
- سرعت یا نرخ جانشینی غیرمترادف در موقعیت کدون‌های اول و دوم اغلب کندتر از جانشینی مترادف در موقعیت سوم باشد.
- انتقال نوکلئوتیدها بیشتر از جابه جایی آن‌ها رخ داده باشد.

نرخ‌های جایگزینی گوناگون سبب سطوح متفاوتی از تمایز تبارشناختی در نواحی مختلف DNA می‌شود. این امر باید در بررسی روابط تبارشناسی در سطوح مختلف رده‌بندی در نظر گرفته شود.

الگوها در توالی بر تناسب داده‌هایی که بایستی در آزمون‌های مختلف تبارشناسی استفاده شوند، تاثیر می‌گذارند:

- سیگنال تبارشناختی: سطحی از تبدیل داده‌های توالی
- اشباع: تغییرات چندگانه در همان جایگاه به دلیل تقسیم لاین‌ها. در طول زمان دو توالی به دلیل تغییرات چندگانه در جایگاه خاص اشباع می‌شوند. افزایش جایگزینی اثر کاهشی بر توالی مدنظر دارد. روابط غیرخطی بین واگرایی توالی و زمان رخ داده و سبب از دست رفتن اطلاعات در فیلوژنی مورد بررسی می‌شوند.
- ترکیب باز/کدون

در حال حاضر توالی‌های 16S rDNA بزرگ ترین مجموعه داده‌های ژنی بوده که هر روزه در حال زیاد شدن است و در مجموعه داده‌های بین‌المللی (بزرگ‌تر از ۳۰۰۰۰) در دسترس هستند و شناسایی مقدماتی باکتری‌های ناشناخته را امکان‌پذیرتر می‌کنند (وان وینتزینگرود و همکاران، ۲۰۰۲). به هرحال، این ژن‌ها همواره دارای اطلاعات نیستند که بتوان آن‌ها را برای مطالعه انتخاب کرد. دایوگا (۲۰۰۲) درخت تبارشناسی ژن‌های 16S و gyrB را بررسی کرد. این ژن‌ها خویشاوندی در *انتروباکتریاسه‌ها* را نشان می‌دهند. ژن yrB دارای یک رونوشت است که در همه باکتری‌ها وجود دارد. این ژن به عنوان نشان‌گر ژنتیکی مناسب برای شناسایی باکتری‌ها پیشنهاد شده است و ATPase را در دامین DNA جیراز[1] رمز می‌کند. دایوگا (۲۰۰۲) دریافت که درخت gyrB در گونه‌هایی که خویشاوندی نزدیک دارند، عامل تعیین کننده قابل اعتمادتری از درخت 16S است. با این وجود از ژن 16S در مقایسه و تمایز گونه‌های با خویشاوندی نزدیک استفاده شده است. انزای و همکاران (۱۹۹۷) همولوگی ۹۳/۹ درصدی در توالی 16S rRNA بین *کرایزئوموناس*[2]، *فلاویموناس*[3] و *سودوموناس* پیدا کردند و بر این اساس پیشنهاد کردند که آن‌ها مترادف هستند. همین‌طور وارویک و همکاران (۱۹۹۴) پیشنهاد کردند که بر اساس شاخه‌های مرکبی[4] که به طور مداوم از آنالیز داده‌های 16S پیدا می‌شوند، *آمیکولاتا*[5] و *سودونوکاردیا*[6] در جنس اصلاح شده‌ی *سودونوکاردیا* قرار گیرند. همچنین براساس داده‌های توالی‌یابی 16S مشاهده شد که *سودونوکاردیا*

1. DNA-gyrase
2. *Chryseomonas*
3. *Flavimonas*
4. Mixed clades
5. *Amycolata*
6. *Pseudonocardia*

واحد هم‌ریشه[1] با *اکتینوبیسپورا*[2] تشکیل می‌دهد و پیشنهاد شده که جنس *اکتینوبیسپورا* با *سودونوکاردیا* مخلوط شود (لی و همکاران، ۲۰۰۰).

۱۷-۴-۱- ویژگی ناحیه 16S

ژن 16S ژنوم باکتریایی رمز ژنتیکی rDNA برای زیرواحد 16S، ریبوزوم را حمل می‌کند. ریبوزوم‌ها اندامک‌هایی هستند که در آن‌ها ترجمه رمزهای ژنتیکی (RNA به پروتئین) رخ می‌دهد و شامل دو زیرواحد از جنس RNA و پروتئین است (تامارین، ۱۹۹۶). اندازه ریبوزوم بر اساس سرعت رسوب آن در فرایند سانتریفیوژ در یک مخزن دارای شیب چگالی اندازه‌گیری می‌شود. واحد رسوب S است و پس از اینکه تی. اسودبرگ[3] این روش را در دهه ۱۹۲۰ ارائه داد، این واحد تعیین شد (تامارین، ۱۹۹۶). زیرواحد 30S ریبوزوم *ای. کولای* شامل یک مولکول 16S rRNA و ۲۱ پروتئین است (تامارین، ۱۹۹۶). این زیرواحد rRNA در DNA یاخته باکتریایی رمز می‌شود و شامل توالی‌های بسیار حفاظت شده است. بنابراین امکان تمایز و تشخیص کافی بین جنس‌ها و گونه‌ها را فراهم می‌کند.

مزایای استفاده از توالی‌های ژن 16S rRNA برای آنالیز جوامع میکروبی به شرح زیر است:

- جزء ضروری ریبوزوم است.
- در همه انواع یاخته‌ها وجود دارد.
- توالی‌های حفاظت شده عمومی و توالی‌های متغیر وابسته به تاکسون دارد که ساختار اولیه شامل توالی‌های حفاظت شده و متغیر امکان مقایسه موقعیت‌های همولوگ در گونه‌های متفاوت را فراهم می‌کند.
- انتقال افقی ژن در آن محتمل نیست.
- مجموعه داده‌ای وسیع (مانند پایگاه ژن[4]) از توالی ژن rRNA وجود دارد.
- «درخت زندگی»[5] مبتنی بر توالی‌های rRNA داربستی برای مقایسه توالی‌های ناشناخته از نمونه‌های طبیعی را فراهم می‌کند.
- به عنوان زمان‌سنج مولکولی عمل می‌کند.
- امکان آنالیز مستقل از کشت برای جوامع ناشناخته را فراهم می‌آورد.

---

1. Monophyletic
2. *Actinobispora*
3. T. Svedberg
4. Gen Bank
5. Tree of Life

۱۷-۴-۲- جفت بازهای مشخص

دو نوع از داده‌های توالی وجود دارد که از راه DNA ژنومی وبرچسب‌های توالی بیان شده[1] (EST ها) ایجاد شده‌اند. DNA ژنومی نماینده مواد ژنتیکی کل موجود در قالب ژنوم است. اطلاعات ژنوم‌ها از آزمایش‌های چندگانه با دقت بالا فراهم آمده است. به هر حال، ESTها قطعات کوتاهی از DNA، معمولاً بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ جفت باز هستند که به mRNA رونویسی شده و سپس به پروتئین‌ها ترجمه می‌شوند. ESTها ۶۲ درصد از ۳۸/۹ میلیون توالی ژنتیکی موجود در پایگاه ژنی را شامل می‌شوند که توالی‌یابی آن‌ها نسبتاً آسان است و می‌توانند برای قرار دادن ژن‌ها و جایگاه‌های اتصال آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند (وو و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر تهیه نقشه ESTها به ژنوم‌های شناخته شده برای یافتن ژن‌ها، خوشهEST، یافتن جایگزین برای جایگاه اتصال و عملکرد ژن بسیار مهم شده است. وو و همکاران (۲۰۰۵) نرم‌افزار رایانه‌ای جدیدی (نقشه‌یاب EST[2]) را توسعه داده‌اند که ۳ تا ۱۰۰۰ برابر سریع‌تر از نرم‌افزارهای تجاری کنونی برای مرتب کردن و خوشه‌بندی توالی‌های DNA و تولید قطعات با کیفیت بهتر است.

1. Expressed sequence tags
2. EST mapper

منابع

Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI (2003) Diversity of fungi in organic soils under a Moorland-Scots pine (Pinus sylvestris L.) gradient. New Phytol 158:569–578.

Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L (2004) Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soils. Chemosphere 57: 401–412.

Anzai Y, Kudo Y, Oyaizu H (1997) The phylogeny of the genera Chryseomonas, Flavimonas and Pseudomonas supports synonymy of these three genera. Int J Syst Bacteriol 47:249–251.

Banks MK, Alleman J (2002) Microbial indicators of bioremediation potential and success. Hazardous substance research centres. Georgia Tech Research Corporation. http://www.hsrc. org/mw-microbial.html.

Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, Paul EA (2003) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Appl Environ Microbiol 69:926–932.

Bodelier PLE, Meima-Franke M, Zwart G, Laanbroek HJ (2005) New DGGE strategies for the analysis of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers. Microb Ecol 52:163–174.

Boon N, De Windt W, Verstraete W, Top EM (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. Microb Ecol 39:101–112.

Bundy JG, Paton GI, Campbell J (2002) Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. J Appl Microbiol 92:276–288.

Chang Bioscience (2004) Primo Melt 3.4: PCR primer design for DGGE and TGGE. http://www. changbioscience.com/ primo/ primomel. html.

Coclin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G (2001) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during

fermentation of Italian sausages. Appl Environ Microbiol 67:5113–5121.

Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 66:5116–5122.

Curtis TP, Craine NG (1998) The comparison of the diversity of activated sludge plants. Water Sci Technol 37:71–78.

Dauga C (2002) Evolution of the gyrB gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. Int J Syst Evol Microbiol 52:531–547.

Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM, Verstraete W (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness, missing links. Environ Microbiol 3:649–657.

England LS, Vincent ML, Trevors JT, Holmes SB (2004) Extraction, detection and persistence of extracellular DNA in forest litter microcosms. Mol Cell Probes 18:313–319.

Ferris MJ, Ward DM (1997) Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined communities in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 63:1375–1381.

Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined communities inhabiting a hot spring microbial mat community. Appl Environ Microbiol 62:340–346.

Foucher ALJL, Bongers T, Noble LR, Wilson MJ (2004) Assessment of nematode biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil. Soil Biol Biochem 36:2027–2032.

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. Environ Microbiol 4:634–643.

Garland JL, Mills AL (1991) Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilisation. Appl Environ Microbiol 57:2351–2359.

Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, Van Elsas JD (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase

chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. J Microbiol Meth 38:1–15.

Gillan DC (2004) The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in North Sea sediments as revealed by DGGE analysis — the importance of the protocol. Mar Pollut Bull 49:504–513.

Helms C (1990) Method: denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). http://hdklab.wustl. edu/lab-manual/dgge/dgge1.html.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl Environ Microbiol 63:3233–3241.

Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J Bacteriol 66:24–26.

Jackson CR, Roden EE, Churchill PF (2000) Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. Mol Biol Today 2:49–51.

Janse I, Meima M, Kardinaal WEA, Zwart G (2003) High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 69:6634–6643.

Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M (2002) 16S ribosomal DNAbased analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 68:699–704.

Kent AD, Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. Ann Rev Microbiol 56:211–236.

Keyser M, Witthuhn RC, Lamprecht C, Coetzee MPA, Britz TJ (2006) PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. Syst Appl Microbiol 29:77–84.

Kim BH, Park HS, Kim HJ, Kim GT, Chang IS, Lee J, Phung NT (2004) Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. Appl Microbiol Biotechnol 63:672–681.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. J Microbiol Meth 58:169–188.

Koizumi Y, Kelly JJ, Nakagawa T, Urakawa H, El-Fantroussi S, Al-Muzaini S, Fukui M, Urushigawa Y, Stahl DA (2002) Parallel characterisation of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridisation, and DNA microarray technology. Appl Environ Microbiol 68:3215–3225.

Kowalchuk GA, Gerards S, Woldendorp JW (1997) Detection and characterization of fungal infections of Ammophila arenaria (Marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. Appl Environ Microbiol 63:3858–3865.

Krieg NR, Holt JG, Murray RGE, Brenner DJ, Bryant MP, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 964.

Lagacé L, Pitre M, Jacques M, Roy D (2004) Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. Appl Environ Microbiol 70:2052–2060.

Lee SD, Kim ES, Hah YC (2000) Phylogenetic analysis of the genera Pseudonocardia and Actinobispora based on 16S ribosomal DNA sequences. Microbiol Lett 182:125–129.

Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM, Verstraete W, Springael D (2005) Occurrence and community composition of fast-growing Mycobacterium in soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. Microb Ecol 51:375–388.

MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Appl Environ Microbiol 65:3566–3574.

Marshall MN, Cocolin L, Mills DA, VanderGheynst JS (2003) Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. J Appl Microbiol 95:934–948.

Milcic-Terzic J, Lopez-Vidal Y, Vrvic MM, Saval S (2001) Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-polluted soil. Biores Technol 78:47–54.

Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr Opin Microbiol 2:317–322.

Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial communities by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700.

Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreå´ L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Am J Soil Sci 64:1382–1388.

Norland S (2004) Gel2K gel analysis software. University of Bergen, Norway. http://www.im.uib. no/~nimsn/program.

Nübel U, Garcia-Pichel F, Kühl M, Muyzer G (1999) Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. Appl Environ Microbiol 65:422–430.

O' Callaghan M, Gerard EM, Heilig GHJ, Zhang H, Jackson TA, Glare TR (2003) Denaturing gradient gel electrophoresis — a tool for plant protection research. N Z Plant Prot 56:143–150.

Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Panssen PH (2005) PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. Microb Lett 248:183–187.

Øvereås L, Torsvik V (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microb Ecol 36:303–315.

Petersen DG, Dahllöf I (2005) Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. Microb Ecol 53:339–348.

Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, Van Elsas JD (1998) Genetic diversity of nifH gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. Appl Environ Microbiol 64:2770–2779.

Sanderson KE (1976) Genetic relatedness in the family Enterobacteriaceae. Annu Rev Microbiol 30:327–349.

Schwieger F, Tebbe CC (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Appl Environ Microbiol 64:4870–4876.

Sei K, Mori K, Kohno T, Maki H (2003) Development and application of PCR primers for monitoring alkane-degrading bacteria in a seawater microcosm during crude oil degradation process. J Chem Eng Jpn 36:1185–1193.

Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B and Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl Environ Microbiol 68:5142–5150.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM 1989 Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. Proc Natl Acad Sci USA 86:232–236.

Smalla K, Wachtendorf U, Heuer H, Lui WT, Forney L (1998) Analysis of BIOLOG GN substrate utilisation patterns by microbial communities. Appl Environ Microbiol 64:1220–1225.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Appl Environ Microbiol 67:4742–4751.

Stamper DM, Walch M, Jacobs RN (2003) Bacterial population changes in a membrane bioreactor for Graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. Appl Environ Microbiol 69:852–860.

Stephen JR, Chang YJ, Gan YD, Peacock A, Pfiffner SM, Barcelona MJ, White DC, McNaughton SJ (1999) Microbial characterisation of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)- based approach. Environ Microbiol 1:231–241.

Tamarin RH (1996) Principles of genetics, 5th edn. Brown Publishers, p 246 Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J (2003) Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 69:220–226.

Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting nirs, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. Appl Environ Microbiol 49:401-417.

Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL (1990a) High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 56:782–787.

Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Øvereås L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J Biotechnol 64:53–62.

Torsvik V, Øvereås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr Opin Microbiol 5:240–245.

Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung CY, Yue S, Singer VL (1999) Characterisation of SYBR gold nucleic acid gel stain: a dye optimised for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. Anal Biochem 268:278–288.

Ueda T, Suga Y, Matsuguchi T (1995) Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. Eur J Soil Sci 46:415–421.

Vallaeys T, Topp E, Muyzer G, Macheret V, Laguerre G, Rigaud A, Soulas G (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. Microb Ecol 24:279–285.

Van Hannen EJ, Mooij W, Van Agterveld MP, Gons HJ, Laanbroek HJ (1999) Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 65:2478–2484.

Volossiouk T, Robb EJ, Nazar RN (1995) Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. Appl Environ Microbiol 61:3972–3976.

Von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based analysis. Microbiol Rev 21:213–229.

Von Wintzingerode F., Böcker S., Schlötelburg C., Chiu N.H., Storm N., Jurinke C., Cantor CR, Göbel UB, Van den Boom D (2002) Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analysed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. Proc Natl Acad Sci USA 99:7039–7044.

Wamberg C, Christensen S, Jakobsen I, Müller AK, Sørensen SJ (2003) The mycorrhizal fungus (Glomus intraradices) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (Pisum sativum). Soil Biol Biochem 35:1349–1357.

Ward DM, Ferris MJ, Nold SC, Bateson MM (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. Microbiol Mol Biol Rev 62:1353–1370.

Warwick S, Bowen T, McVeigh H, Embley TM (1994) A phylogenetic analysis of the family Pseudonocardiaceae and the genera Actinokineospora and Saccharothrix with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera Amycolata and Pseudonocardia in an emended genus Pseudonocardia. Int J System Bacteriol 44:293–299.

Watve MG, Gangal RM (1996) Problems in measuring bacterial diversity, and a possible solution. Appl Environ Microbiol 62:4299–4301.

White DC, Flemming CA, Leung KT, MacNaughton SJ (1998) In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of population remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. J Microbiol Meth 32:93–105.

Whyte LG, Goalen B, Hawari J, Labbé D, Greer CW, Nahir M (2001) Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-polluted soils from Eureka, Nunavut. Cold Regions Science and Technology 32:121–132.

Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus Pseudomonas (sensu stricto) in environmental samples. Appl Environ Microbiol 64:2545–2553.

Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ (1999) Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a douglas firforest site in the Oregon Cascade mountain range. Appl Environ Microbiol 65:374–380.

Wikipedia (2007) The Free Encyclopedia, http://en.wikipedia.org/ wiki/ Catalase-test.

Wu X, Lee WJ, Tseng C (2005) ESTmapper: Efficiently aligning DNA sequences to genomes. Proceedings of the Nineteenth IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS). IEE Computer Society.

Zuccaro A, Schultz B, Mitchell JI (2003) Molecular detection of ascomycetes associated with Ficus serratus. Mycol Res 107:1451–1466.

فصل هجدهم

ابزارهای مولکولی برای پالایش و صحت‌سنجی زیست‌پالایی

Ben Stenuit, Laurent Eyers, Luc Schuler,
Isabelle George, and Spiros N. Agathos

۱۸-۱- مقدمه

جایگاه‌های دفن مواد زائد خطرناک در دنیا ناشی از ساخت، ذخیره، استفاده یا دفن ترکیب‌هایی مانند هیدروکربن‌های نفتی، نیتروآروماتیک‌ها، هالوژن‌های آلی، آفت‌کش‌ها و فلزها هستند. بسیاری از این آلاینده‌ها ترکیب‌های سنتزی یا زیست‌بیگانه هستند. آن‌ها به دلیل ساختار یا استخلاف‌ها (مانند گروه نیترو در نیتروآروماتیک‌ها) که به طور معمول در طبیعت وجود ندارد، تمایل به انباشته شدن در محیط را دارند. بنابراین، به آسانی توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی موجود شناسایی نمی‌شوند (استنوئیت و همکاران، ۲۰۰۵). برای رسیدگی به چالش پاک‌سازی جایگاه‌های آلوده به روش پایدار و سبز، تکنولوژی‌های زیست‌پالایی این مزیت جالب را دارند که ریزجانداران مورد استفاده در آن‌ها دارای تنوع کاتابولیک برای سمیت‌زدایی یا تبدیل مواد زائد هستند. به هر حال، اجرای تکنیک‌های زیست‌پالایی در محل به دلیل دشواری در کنترل و تعمیم فرایندهای کلیدی تجزیه زیستی از آزمایشگاه به مقیاس بزرگ‌تر، همیشه هم موفقیت‌آمیز نیست (پارل و استپِ، ۲۰۰۳). این امر در رکوردهای مختلط تر آزمایش‌های تقویت زیستی نشان داده شده است (الفانتروسی و آگاتوس، ۲۰۰۵). از این نظر، در راکتورهای زیستی و سایر محیط‌های محدود در مقایسه با بیشتر زیست‌بوم‌های باز در مقیاس بزرگ، قابلیت کنترل و مدیریت بیشتری از نظر قابل پیش‌بینی بودن، پویایی جمعیت میکروبی کاتابولیک و نظارت بر فرآیند وجود دارد. با این وجود، زیست‌پالایی میدانی و در محل می‌تواند با اعتماد بیشتری هدایت شود. زیرا همانند راکتورهای زیستی پارامترهای عملکردی مرتبط با پیشرفت تجزیه آلاینده می‌تواند ردیابی و کنترل شود.

زیست‌پالایی چه کاهش طبیعی باشد، و چه تحریک یا تقویت زیستی، نیازمند درک مناسب از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیط آلوده و همین‌طور ویژگی‌های جزئی جوامع میکروبی درگیر در فرایندهای کلیدی فیزیولوژیک است. جایگاهی که برای زیست‌پالایی تعیین شده بایستی از نظر ژئوشیمیایی و هیدرولوژیکی کامل شناخته شده باشد، ماهیت شیمیایی آلاینده موجود و همین‌طور جبهه آلودگی مشخص باشد. ارزیابی جامعه میکروبی، توانایی آن برای تجزیه زیستی آلاینده هدف و تداوم این توانایی، فاکتورهای مهم و موثر در طراحی و اجرای برنامه‌های زیست‌پالایی هستند. برای مثال، بررسی پاسخ جامعه میکروبی وقتی که جایگاه آلوده با مایه تلقیح میکروبی فعال تحت تقویت زیستی قرار می‌گیرد، لازم و ضروری است. به عنوان یک اصل کلی، پایش جامعه میکروبی درگیر در پاک‌سازی جایگاه آلوده، فاکتور مهمی در توصیف، برآورد و کنترل فرایند است و در حالت ایده‌آل باید در همه سطوح یعنی مقیاس آزمایشگاهی، پایلوت و میدانی اجرا شود.

برای اینکه چنین بررسی‌هایی تا حد ممکن کامل و معنی‌دار باشند، نیاز به این است که جوامع میکروبی از نظر ساختار، فنوتیپ، پتانسیل، عملکرد و برهم‌کنش با محیط شناسایی شوند

(ریتمن و همکاران، ۲۰۰۶). از آنجا که ۹۰ تا ۹۹ درصد از میکروب‌هایی که در محیط زندگی می‌کنند برای رشد به روش‌های کشت رایج روی محیط‌های جامد و مایع در آزمایشگاه مقاومت می‌کنند (امان و همکاران، ۱۹۹۵)، یک پیشرفت مهم از نظر مفهومی و روش آزمایش در بوم‌شناسی میکروبی در دهه ۱۹۹۰ رخ داد که کاربرد ابزارهای مولکولی مستقل از کشت در مطالعه تنوع و پویایی جامعه میکروبی با جزئیات دقیق را امکان‌پذیر ساخت. در چند سال گذشته، این ابزارهای قدرتمند سبب توصیف کیفی (مانند روش‌های انگشت‌نگاری) و کمی (مانند دات بلات[1] و هیبریداسیون فلورسنت درجا یا PCR با زمان واقعی[2]) جوامع میکروبی محیط شده‌اند و ابزارهایی در شناسایی اُپرون‌های جدید کاتابولیک برای تجزیه مواد زیست‌بیگانه در باکتری‌های محیط را فراهم کرده‌اند. به هر حال، کاربرد آن‌ها اغلب زمان‌بر بوده و به تعداد کمِ نمونه‌ها محدود می‌شوند که اجازه‌ی شناسایی جامعِ یک زیست‌بوم را نمی‌دهد. برای مقابله با این مشکل، روش‌های پُربروندادِ در حال ظهور هستند. این روش‌ها که دارای مزیت مینیاتوری شدن، خودکارسازی و اجرای موازی مراحل زمان‌بر در مقیاس گسترده هستند، امکان آنالیز هم‌زمان نمونه‌های چندگانه در «زمان واقعی» را فراهم می‌کنند. به موازات این، به خاطر بانک داده‌های توالی‌یابی در حال گسترش (مانند فنّاوری جدید پایروسکوئنسینگ ۴۵۴) و کاهش هزینه‌های توالی‌یابی ژنوم، تعدا ژنوم باکتری‌های توالی‌یابی شده افزایش چشم‌گیری یافته است و شامل آن دسته از باکتری‌هایی که در حذف ترکیب‌های سخت تجزیه شونده دخیل هستند (گلیشین و همکاران، ۲۰۰۳؛ کوبه و همکاران، ۲۰۰۵) و نیز ژنوم کامل جوامع (دئوتشبائر و همکاران، ۲۰۰۶) می‌شود. انتظار می‌رود که در آینده نزدیک کاربرد مخلوطی از این روش‌های ژنومی با تکنیک‌های پساژنومی مانند آنالیزهای عملکردی متاپروتئوم[3] پُربروندادِ (رم و همکاران، ۲۰۰۵)، درک جامعی از ترکیب و عملکرد جوامع میکروبی محیطی، از جمله آن‌هایی که در جایگاه‌های زیست‌پالایی فعال هستند، را فراهم آورند.

۱۸-۲- تکنیک‌های پُربروندادِ در شناسایی جایگاه‌های آلوده

در حال حاضر شماری از روش‌های مولکولی مستقل از کشت مانند تکنیک‌های انگشت‌نگاری، PCR زمان واقعی، ریزآرایه‌ها، متاژنومیک[4]، متاترنسکریپتومیک[5]، متاپروتئومیک[6] یا متابولومیک[7] برای

1. Dot blot
2. Real-time PCR
3. Metaproteomes
4. Metagenomics
5. Metatranscriptomics
6. Metaproteomics
7. Metabolomics

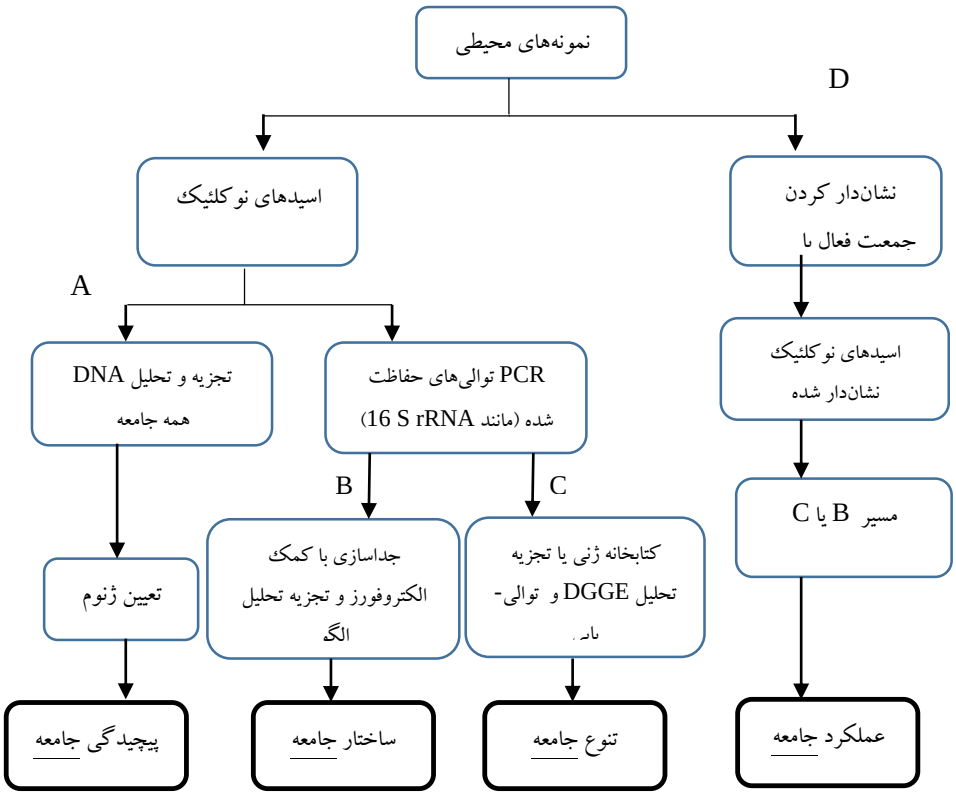
مطالعه جوامع میکروبی پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرند که با رویه‌های پُربروندادسازگار هستند. این تکنیک‌ها در ادامه مورد بحث واقع شده‌اند. پتانسیل آن‌ها به عنوان ابزارهای اصولی ضروری در زمینه زیست‌پالایی جایگاه‌های آلوده در شکل ۱۸-۱ به صورت خلاصه آمده است. اطلاعات دقیق‌تر درباره‌ی جایگاه‌های آلوده در زمان‌های مختلف طی دوره‌ی اجرای زیست‌پالایی را می‌توان، باتوجه به جامعه میکروبی موضعی به دست آورد. به طور دقیق‌تر، پیچیدگی (A)، ساختار (B) و تنوع (C) جامعه را می‌توان بر اساس استخراج اسید نوکلئیک از نمونه‌های محیطی و آزمون‌های بعدی بررسی کرد (شکل ۱۸-۱). افزون بر این، روش‌های مولکولی (مبتنی بر DNA یا RNA) به همراه نشان‌دار کردن جمعیت فعال نمونه با استفاده از تلفیق کاوشگر ایزوتوپ‌های پایدار[1] (SIP) یا بروموداُکسی یوریدین[2] (BrdU) (D، شکل ۱۸-۱) می‌تواند با اطلاعات بالا (یعنی کدام باکتری در آن محل حضور دارد) و عملکرد جامعه (هر باکتری چه کاری انجام می‌دهد) همبستگی داشته باشد.

۱۸-۲-۱- تکنیک‌های انگشت‌نگاری

تکنیک‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی یک الگو یا نیم‌رخ ویژه از جامعه میکروبی ارائه می‌دهند. آن‌ها بر اساس جداسازی قطعات تبارشناختی (مانند 16S rRNA) یا ژن‌های عملکردی PCR شده هستند که توسط آغازگرهای خاص یا عمومی تکثیر شده‌اند. برخی از این تکنیک‌های انگشت‌نگاری پتانسیل طراحی پُربروندادمانند چندشکلی در طول قطعات انتهایی محدودالاثر (T-RFLP)، آنالیز ناهمگنی در طول توسط PCR (LH-PCR)، چندشکلی آرایش تک‌رشته‌ای (SSCP)، الکتروفورز روی ژل با شیب واسرشته‌کننده (DGGE)، یا آنالیز جداکننده بین‌ژنی ریبوزومی (RISA) را دارند.

1. Stable isotope probing
2. Bromodeoxyuridine

اندازه‌گیری تنوع میکروب‌های غیرقابل کشت



شکل ۱۸-۱ راه‌کارهای بررسی مبتنی بر تجزیه و تحلیل همه اسیدهای نوکلئیک یک جامعه میکروبی به منظور شناخت پیچیدگی، ساختار، تنوع و عملکرد جمعیت‌های میکروبی در محیط (برگرفته از Daffonchio, 2005)

در T-RFLP قطعات به دست آمده توسط برش آنزیمی در محصولات PCR و بر اساس اندازه آن‌ها جدا می‌شوند. استفاده از آغازگرهای نشان‌دار امکان شناسایی سریع، خودکار و پُربروندا قطعات انتهایی چندشکل را فراهم می‌کند. قطعات جداشده با توالی‌یابی خودکار DNA به صورت اوج‌هایی روی الکتروفروگرام[1] دیده می‌شود. افزون بر این، اوج‌های T-RFLP را می‌توان به طور مستقیم با مقایسه آن‌ها با پایگاه‌های داده‌ای شناسایی کرد (مارش و همکاران، ۲۰۰۰). الکتروفورز ژل با شیب واسرشته‌کننده (DGGE)، تکنیک دیگری است که مبتنی بر جداسازی قطعات PCR

1. Electropherogram

بر اساس توالی آن‌ها است. در این روش الگویی از نوارها روی ژل ایجاد می‌شود که برای شناسایی روابط رده‌بندی بریده شده و توالی‌یابی می‌شوند (ایرز و همکاران، ۲۰۰۴a). نسخه پُربروندادِ DGGE، یعنی کروماتوگرافی مایع واسرشته‌کننده با کارایی بالا[1] (D-HPLC)، قطعات DNA را با استفاده از کروماتوگرافی جفت یونی فاز معکوس سریع و تکرارشونده در عرض چند دقیقه جدا می‌کند (بارلان و همکاران، ۲۰۰۵). سپس می‌توان قطعات را برای توالی‌یابی خودکار در انتهای ستون جمع کرد. در روش RISA، ناحیه جدا کننده‌ی رونویسی شده‌ی بین‌ژنی[2] (ITS) که بین ژن‌های ریبوزومی 16S و 23S واقع شده است، هدف قرار می‌گیرد. RISA امکان جداسازی بالاتری در نیم‌رخ جامعه در مقایسه با تکنیک‌های مبتنی بر 16S یا 23S فراهم می‌کند، چراکه ناحیه ITS هم در طول و هم در توالی نوکلئوتیدی ناهمگنی بیشتری از ژن‌های جانبی‌اش دارد. همانند T-RFLP یا SSCP، یک روش خودکار پیشنهاد شده (فیشر و تریپلت، ۱۹۹۹) که در آن ۱) یک آغازگر نشان‌دار شده‌ی فلورسنت برای PCR استفاده می‌شود و ۲) مرحله الکتروفورز با سامانه خودکار اجرا می‌شود.

افزون بر این روش‌های انگشت‌نگاری، اخیراً دو روش نشان‌دار کردن یا برچسب‌گذاری برای تعیین نیم‌رخ پُربروندادِ برای جوامع میکروبی پیچیده توسعه داده شده است: آنالیز سریالی توالی‌های نشان‌دار ریبوزومی/DNA ریبوزومی[3] (SARTS یا SARD) (آشبی و همکاران، ۲۰۰۷) و برچسب‌های نشان‌دار تک نقطه‌ای ژنوم[4] (SP-GSTs) (واندر لِلیه و همکاران، ۲۰۰۶). این تکنیک‌ها انگشت‌نگاری جامعه میکروبی را به شکل کُنکاتِمِرهایی[5] با توالی‌های نشان‌دار تکثیر شده در PCR فراهم می‌کند. در روش SARST/SARD، هدف تکثیر در PCR، توالی‌های سرشار از اطلاعات کوتاه از نواحی بسیار متغیر ژن‌های 16S rRNA باکتریایی است. سپس محصولات PCR به هم متصل شده تا کُنکاتِمِرهایی با فرآورده‌های PCR چندگانه که سریالی مرتب شده‌اند، ایجاد کند که در ادامه کلون شده و توالی‌یابی می‌شوند تا ترکیب جامعه میکروبی مشخص شود. در این راه، توالی‌های ریبوزومی نشان‌دار چندگانه[6] (RSTs) از تعداد زیادی از موجودات متفاوت به دست آمده است که به طور هم‌زمان متعلق به یک واکنش توالی‌یابی بودند. الحاق تبارشناختی هر RTS با مقایسه توالی‌های نشان‌دار با پایگاه داده‌ای جامع توالی‌های rRNA با طول کامل از فیلوتیپ‌های شناخته شده امکان‌پذیر است. تکنیک SARST می‌تواند نقش‌های کمی و کیفی بوم‌شناختی

1. Denaturing high performance liquid chromatography
2. Intergenic transcribed spacer
3. Serial analysis of ribosomal sequence tags/ribosomal DNA
4. Single-point genome signature tags
5. Concatemers
6. Multiple ribosomal sequence tags

باکتری‌های نادر را شناسایی کرده و اگر با تکنولوژی ریزآرایه‌ها ترکیب شود نتایج امیدوارکننده‌ای ارائه می‌دهد. این امر در مورد ریزآرایه‌های طراحی شده با پروب‌های خاص برای فراوان‌ترین فیلوتیپ در جایگاه‌های آلوده به هگزاکلروسیکلوهگزان نشان داده شده است (نیوفلد و همکاران، ۲۰۰۶). سرانجام، روش SP-GSTs مشابه روش SARST است. اما امکان گسترده‌تری برای مطالعه ترکیب جامعه میکروبی ایجاد می‌کند که در آن نه تنها ژن‌های نشان‌گر تبارشناختی، بلکه توزیع ژن‌های خاص عملکردی (مانند ژن‌های تجزیه زیستی) را هم می‌توان بررسی کرد.

۱۸-۲-۲- PCR زمان واقعی

در PCR زمان واقعی پیشرفت واکنش PCR با شناسایی و تعیین کمی مولکول گزارشگر فلورسنت که به رشته الگوی هدف در PCR می‌چسبد، پایش می‌شود. از مقدار نشر فلورسنت در هر چرخه از فاز نمایی، امکان محاسبه مقدار اولیه الگوی هدف وجود دارد. PCR زمان واقعی حساسیت بالایی دارد و حد تشخیص آن ۱ تا ۲ رونوشت از ژنوم است (انگلایس و کالیسچوک، ۲۰۰۴). این روش را می‌توان با ریزآرایه‌ها (در ادامه آمده است) که حساسیت ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر کمتر از PCR دارد و یک مشکل بالقوه در توالی‌های با فراوانی ضعیف است، مقایسه کرد (اِیرز و همکاران، ۲۰۰۴b). در PCR زمان واقعی نیاز به هیچ‌کدام از گام‌های پر زحمت بعدی در تعیین کمی محصولات PCR نیست. زیرا مقدار آن‌ها در زمان واقعی پایش می‌شود. بنابراین PCR زمان واقعی یک روش پُربروندادِ با حساسیت آنالیز عالی در شناسایی و تعیین کمی ژن‌های خاص در نمونه‌های محیطی است (هارمس و همکاران، ۲۰۰۳). روش انگشت‌نگاری کمی که ترکیبی از PCR زمان واقعی و T-RFLP است، تعیین هم‌زمان فراوانی میکروبی و تنوع در جامعه پیچیده‌ی فاضلاب را امکان‌پذیر می‌سازد (یو و همکاران، ۲۰۰۵). با ترکیب این روش با کاوش ایزوتوپ پایدار (SIP)، ریزجانداران تجزیه کننده نفتالن فعال در محیط کوچک خاکی به طور هم‌زمان شناسایی و تعیین کمی شده‌اند (یو و چو، ۲۰۰۵).

۱۸-۲-۳- ریزآرایه‌های DNA

ریزآرایه‌ها یا ریزتراشه‌ها[1] از جنس DNA تک رشته‌ای یا مولکول RNA (مولکول هدف) هستند که می‌توانند با مولکول مکمل (پروب) که به یک حامل جامد چسبیده، هیبرید شوند (ژو، ۲۰۰۳). ریزآرایه‌ها در قیاس با هیبریداسیون غشایی اسید نوکلئیک مرسوم، این مزیت‌ها را دارند که مینیاتوری هستند (یعنی هزاران پروب را می‌توان روی یک اسلاید مستقر کرد) و حساسیت بالا و

1. Microchips

شـــنـاســـایی ســـریعی (زمـان واقعی) دارند (اِیرز و همکاران، ۲۰۰۴b). افزون بر این، با گنجاندن پروب‌های تکی متصـل نشده روی آرایه می‌توان از اختصاصی بودن اتصال پروب-هدف مطمئن شد. این پروب‌ها، به تشـخیص سیگنال‌های ویژه‌ی توالی‌ها از سیگنال‌های غیراختصاصی کمک می‌کنند. رنگ‌های فلورسـنت را هم می‌توان به روش آنزیمی یا شـیمیایی با نمونه تلفیق کرد تا با آن هیبرید شـوند، بنابراین قرائت یا شـناسایی ریزآرایه‌ها بر اساس شناسایی سیگنال‌های فلورسنت خواهد بود. افزون بر این، نمونه‌های محیطی را می‌توان پیش از هیبریداسـیون در حضـور سوبستراهای نشان‌دار رادیواکتیو انکوباسـیون کرد تا ریزجانداران درگیر در متابولیسـم سـوبسـترای خاص یعنی آرایه‌ی ایزوتوپ[1]، شناسایی شوند (واگنر و همکاران، ۲۰۰۶).

در ژنومیک محیط زیستی، سه دسته اصلی از ریزآرایه‌ها ارائه شده‌اند: ۱) آرایه‌های تبارشناختی الیگونوکلئوتیدی[2] (POA ها)، که دارای کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی برای هدف قرار دادن ژن‌های رده‌بنـدی (مـانـنـد ژن 16S rRNA) هســـتنـد، ۲) آرایـه‌های ژن‌های عملکردی[3] (FGA ها)، که کاوشگرهای آن‌ها ژن‌های رمزگر آنزیم‌های کلیدی درگیر در فرایندهای خاص را هدف قرار می‌دهند و ۳) آرایه‌های ژنوم جامعه[4] (CGAs) که از کل DNA ژنومی گونه‌ها یا سویه‌های متفاوت بازسازی شده‌اند (ژو، ۲۰۰۳). طراحی پروب‌ها برای POA و FGA بر اساس توالی‌هایی است که از پایگاه‌های داده بازیابی شـده‌اند. به همین دلیل، این ریزآرایه‌ها دسـترسی به وابستگی یا نسبت تبارشناختی و فعالیت‌های عملکردی ناشـــناخته ندارند. با توجه به اینکه محیط‌های طبیعی منبع ســـرشـــاری از توالی‌های ناشناخته هستند، این امر مهم‌ترین نقطه ضعف آنالیز ریزآرایه‌های مرسوم است (گنتری و همکاران، ۲۰۰۶). برای غلبه بر این کاسـتی، همسـانه‌سازی کتابخانه باکتری‌های محیطی که توالی ژنومی آن‌ها هنوز شـنـاسـایی نشـده اسـت را می‌توان در ریزآرایه قرار داد. برای نمونه یک کتابخانه همسانه‌ای از ریزجاندار خاص را می‌توان روی ریزآرایه چاپ کرده و آن را با mRNA جدا شده پیش و پس از قرار گرفتن ریزجـانـدار در معرض یـک تیمار خاص، هیبرید کرد. تفاوت در الگوی هیبرید شدن امکان شناسایی کلون‌هایی که در پاسخ به تیمار، ژن بیان شده یا سرکوب شده دارند را فراهم می‌کند.

گام بعدی این اسـت که از پروب‌هایی که به طور مسـتقیم از DNA محیطی ساخته می‌شوند و در آن‌ها مرحله کشت در نظر گرفته نمی‌شود، استفاده شود. این کار به معنای ترکیب متاژنومیک با ریزآرایه‌ها اسـت (استخراج مستقیم و همسانه‌سازی ژنوم‌های جمع‌آوری شده از یک بیوتوپ، بخش

1. Isotope arrays
2. Phylogenetic oligonucleotide arrays
3. Functional gene arrays
4. Community genome arrays

بعـدی را ببینیـد). فنّـاوری آرایـه‌هـای متاژنومی (MGA) هنوز در آغاز راه اســـت. اما برای غربال نمونه‌های محیطی پُربروندادد در مراحل گوناگون تیمار مانند جایگاه‌های آلوده بســـیار اُمیدوار کننده اسـت. زیرا نیازی به آگاهی قبلی از توالی جامعه میکروبی (جامعه‌ای که می‌خواهد آنالیز شود) ندارد (گنتری و همکاران، ۲۰۰۶). پیشـرفت جالب‌توجه دیگر در راستای استفاده از ریزآرایه‌ها در مطالعه پویایی در محل جوامع میکروبی، توســـعه اخیر FGA جامع توســـط ژو و همکارانش اســـت (هی و همکاران، ۲۰۰۷b). هدف این ریزآرایه که نامش زمین‌تراشــه[1] اســت، فراهم کردن ارتباط مســتقیم بین فرایندهای زیســـت ژئوشـــیمیایی و فعالیت‌های عملکردی جوامع میکروبی در زیســـتگاه‌های گوناگون اســـت. این ریزآرایه ۲۴۲۴۳ پروب الیگونوکلئوتیدی (۵۰ واحدی) دارد که بیش از ۱۰۰۰۰ ژن درگیر در چرخـه نیتروژن، کربن، گوگرد و فســـفر، احیای فلزها و مقاومت و تجزیه آلاینده‌های آلی را در بر می‌گیرد. نســل جدید این ریزآرایه به نام زمین‌تراشــه، چندین ویژگی دیگر هم دارد که حضور نشان‌گر تبارشناختی gyrB یکی از آن‌ها است (هی و همکاران، ۲۰۰۷a).

اســـتفـاده از فنّاوری آرایه‌ها در نمونه‌های محیط زیســـتی نیاز به غلبه بر چالش‌های عمده در اختصـاصی بودن، حساسیت و تعیین کمی دارد (گنتری و همکاران، ۲۰۰۶). مساله اختصاصی بودن به ویژه در POAهای هیبرید شـــده با rRNA مهم اســـت، چراکه برخی از نواحی مولکول rRNA حفـاظـت‌شـــدگی بـالایی دارد و پـایـداری ســـاختار دومِ زیرواحد کوچک rRNA می‌تواند جلوی هیبریداسـیون مناسـب را بگیرد و حسـاسـیت را پایین بیاورد. مسـاله اختصاصی بودن را می‌توان با آزمون تفکیک حرارتی حل کرد. این آزمون چسـبیدن کامل پروب-هدف و نچسـبیدن آن را آشکار می‌کند (اِلفانتروسی و همکاران، ۲۰۰۳).

حساسیت ریزآرایه‌ها در استفاده از آن‌ها در نمونه‌های محیطی می‌تواند مشکل‌ساز باشد. چرا که آلاینـده‌هـای بـالقوه (مـانـنـد اســـیدهای هیومیک) در این نمونه‌ها می‌توانند از واکنش‌های آنزیمی جلوگیری کرده و ســـیگنال‌های پس‌زمینه‌ای بالایی در ریزآرایه تولید کند. پروتکل‌هایی وجود دارد کـه بـا آن‌هـا بتوان از محیط‌هـای پیچیده مانند خاک و رســـوب، RNA و DNA با خلوص کافی اســـتخراج کرد (اِلفانتروســـی و همکاران، ۲۰۰۳). معمولاً مقدار کافی از rRNA محیطی را می‌توان بدون نیاز به تکثیر پیش از هیبریداســـیون، اســـتخراج کرد (اِلفانتروســـی و همکاران، ۲۰۰۳). وقتی DNA یا mRNA مولکول هدف باشـند، برای رسـیدن به سطح حساسیت مورد قبول، تکثیر آن‌ها ضروری است. به دلیل اُریبی و محصولات مرتبط با آن، تکثیر PCR بایستی با احتیاط صورت گیرد (ســـوزوکی و جیووانونی، ۱۹۹۶؛ پولز وکـاوانـاف، ۱۹۹۸). به جای آن، می‌توان تکثیر کل ژنوم را با DNA پلیمراز phi29 و آغـازگرهـای مقاوم به اگزونوکلئاز تصـــادفی و بدون نیاز به چرخه حرارتی

1. Geochip

تکثیر کرد. تکثیر به این روش، به طرز شگفت‌انگیزی در طول ژنوم هدف در مقایسه با تکثیر کل ژنوم مبتنی بر PCR یکنواخت عمل می‌کند (دین و همکاران، ۲۰۰۲). برای آنالیز ساختار جامعه میکروبی زیست محیطی، DNA جامعه میکروبی تکثیر شده با DNA پلیمراز phi29 به طور موفقیت‌آمیزی با ریزآرایه‌های ژنوم جامعه هیبرید شد و کاربرد آن در نمونه‌های آب زیرزمینی که DNA میکروبی در اندازه کمتر از نانوگرم داشتند هم نشان داده شده است. (وو و همکاران، ۲۰۰۶). وقتی که هدف تنها پایش ژن‌های موجود نباشد، بلکه ژن‌های رونویسی شده، یعنی ژن‌های عملکردی (آنالیز مبتنی بر mRNA) را هم شامل شود، روش تکثیر خطی مبتنی بر پلیمراز T7 با استفاده از آغازگرهای جوش خورنده[1]، مقدار کافی از mRNA برای آنالیز عملکرد جامعه میکروبی فراهم می‌کند (گائو و همکاران، ۲۰۰۷).

سرانجام، تعیین کمی چالش سوم است. وو و همکاران (۲۰۰۱) با FGAها و CGAها در غلظت چهار برابری DNA جدا شده از کشت‌های خالص و جوامع مخلوط، رابطه خطی بین شدت سیگنال و غلظت DNA را به دست آوردند. در سوی دیگر، تعیین کمی جوامع میکروبی با POAها دشوار است. زیرا هیبریداسیون متقاطع در نمونه‌های محیطی پیچیده که دارای هدف‌های هیبرید شده کامل و ناقص با مقدار نامعلوم هستند، ممکن است رخ دهد (چندلر و همکاران، ۲۰۰۶). در اینجا هم استفاده از منحنی تفکیک حرارتی برای تعیین کمی درست نمونه‌های محیطی اُمیدوار کننده است (ویک و همکاران، ۲۰۰۶).

۱۸-۲-۴- متاژنومیک

متاژنومیک یا همان آنالیز کل ژنوم جمع‌آوری شده از محیط موردنظر، دسترسی مستقیم به اندوخته کل ژنوم محیط را بدون محدودیت‌های کشت آزمایشگاهی گونه‌های میکروبی، فراهم می‌کند (اِیرز و همکاران، ۲۰۰۴b). معمولاً واژه متاژنومیک به ایجاد کتابخانه متاژنومیکی اطلاق می‌شود که شامل موارد زیر است: ۱) ایجاد قطعات DNA با اندازه مناسب، ۲) اتصال قطعات به حامل‌های همسانه‌سازی مناسب (حامل‌های کازمید[2]، فازمید[3]، یا کروموزوم مصنوعی باکتریایی[4] (BAC))، ۳) وارد کردن حامل‌های نوترکیب به میزبان همسانه‌سازی باکتریایی مناسب و ۴) غربال همسانه‌های دارای فعالیت یا توالی‌های خاص (دانیل، ۲۰۰۵). متاژنومیک، بازیابی توالی‌ها یا عملکردهای ناشناخته از محیط را امکان‌پذیر می‌سازد، در حالی‌که روش‌های مبتنی بر تکثیر PCR

1. Fusion
2. Cosmid
3. Fosmid
4. Bacterial artificial chromosome

یـا ریزآرایـه‌ها (POA یا FGA) اطلاعات اولیه‌ای ازتوالی ژن‌ها فراهم می‌آورند.جداســـازی DNA ژنومی از محیط‌های پیچیده‌ای مانند لجن، فاضـــلاب، رســـوب یا خاک، چالش‌های مهمی از منظر کیفیـت (آلاینـده‌های بازدارنده هم غالباً اســـتخراج می‌شـــوند)، اندازه مولکولی (معمولاً DNA به قطعات با اندازه کوچک‌تر بریده می‌شود) و نمایش همه ژنوم میکروبی (معمولاً بخش‌بندی بر اساس اندازه یا نرمال‌سـازی آزمایشی ضرورت دارد) ایجاد می‌کند (کوان و همکاران، ۲۰۰۵). افزون بر این، در برخی از محیط‌ها که آلودگی شـدیدی دارند و تراکم یا غلظت یاخته‌ها در آن‌ها خیلی کم است، اســتخراج مســتقیم DNA متاژنومی، مواد ژنومی کافی برای ایجاد کتابخانه ژنومی بعدی به دســت نمی‌دهد. در این‌صـورت لازم اسـت از روش‌های جدید تکثیر مستقل از PCR مانند تکثیر جایگزین شـونده‌ی چندگانه (MDA) با استفاده از DNA پلیمراز phi29 استفاده شود (ابولنسیا و همکاران، ۲۰۰۶؛ بینگا و همکاران، ۲۰۰۸). اگرچه این روش‌ها دارای اُریبی تکثیر هســتند اما از مقدار بســیار کمِ DNA میکروبی اطلاعات ژنتیکی به دســت می‌دهند که در غیر این‌صــورت غیرقابل دســترس هستند (ابولنسیا و همکاران، ۲۰۰۶).

برای جســـت‌وجوی تنوع ژنتیکی یا عملکردی در کتابخانه‌های متاژنومیکی می‌توان راه‌کارهای غربـال‌گری طراحی کرد. در آنـالیزهـای مبتنی بر عملکرد، همســـانه‌های موردنظر را می‌توان از راه تعیین بیان ناهمگن صـــفت موردنظر انتخاب یا غربال کرد. به هر حال، آنالیز مبتنی بر عملکرد، به دلیل شـناسـایی چشـمی موارد زیر، کارایی کمی دارد: ۱) عدم رشـد باکتری شـاخص، ۲) فعالیت متابولیکی (ناحیه شـفاف یا رنگی پیرامون کلنی روی محیط جامد خاص)، یا ۳) رشـد روی محیط کشـت گزینشـی (مانند محیط کشـت دارای مواد زیسـت‌بیگانه به عنوان منبع کربن) (هندلسـمن، ۲۰۰۵). خوشـــبختـانـه غربال‌گری کتابخانه را می‌توان با بردارنده‌ی کلنی خودکار، ربات‌های پیپت کننده، اسـتفاده از پلیت‌های میکروتیتر، مدیریت داده مبتنی بر انفورماتیک و بررسـی حساسیت در دامنه وسیعی از مولکول‌های زیستی، تسهیل کرد. چون موفقیت غربال‌گری معمولاً کم است (کمتر از ۲ مورد در هر ۱۰۰۰۰ همسـانه، آنزیم‌های صـنعتی مرتبط را دارند)، استفاده از خودکارسازی در آن بسیار مناسب است (لورنز و اک، ۲۰۰۵). به هر حال، نسبت موفقیت در غربال‌گری را می‌توان با روش‌های زیر بهبود بخشـید: ۱) اسـتفاده از میزبان‌های گوناگون بیان ژن، ۲) استفاده از راه‌کارهای متنوع برای تقویـت/گزینش ژنوم‌هـای جـامعـه از نظر صـــفـت‌های مطلوب پیش از ایجاد کتابخانه متاژنومیکی، ۳) استفاده از محیط‌های غنی شده‌ی مایع برای غربال‌گری هم‌زمانِ چند همسانه و ۴) توســعه‌ی راه‌کار جدید غربال‌گریِ پُربروندادِ ســازگار با مرتب‌ســازی یاخته‌های کلون‌ها بر اســاس فعال‌سازی فلورسنت (بازدهی $۱۰^{۹}$ رخداد در روز) (رابرتسون و استیر، ۲۰۰۴).

در آنالیز مبتنی بر توالی، کلون‌های مورد نظر بر اساس حضور نواحی حفاظت شده در ژن‌های نشان‌گر تبارشناختی (مانند ژن‌های 16S rRNA)، یا ژن‌های عملکردی رمزگر فرایندهای کلیدی مانند اکسیژنازها شناسایی می‌شوند (اروین و همکاران، ۲۰۰۵). از PCR و هیبریداسیون معمولاً برای غربال کردن استفاده می‌شود. از آغازگرهای مناسب یا پروب‌های خاص که با توجه به اطلاعات پایگاه‌های داده طراحی شده‌اند، کمک گرفته می‌شود. بنابراین آنالیز مبتنی بر توالی تنها می‌تواند برای شناسایی اعضای خانواده‌ی ژن شناخته شده یا واریانت‌های جدید از گروه‌های پروتئینی که عملکرد شناخته شده دارند، به کار رود (دانیل، ۲۰۰۵). در مواردی که ژن‌های عملکردی و تبارشناختی در یک جایگاه کتابخانه‌ای قرار دارند، کتابخانه‌های DNA بزرگ امکانات بیشتری برای بازیابی کلاستر ژن‌های عملکردی و ارتباط عملکرد متابولیکی بالقوه با یک ریزجاندار خاص را فراهم می‌کنند (دی لانگ و همکاران، ۲۰۰۶). در مقابل اگر هدف، متاژنوم کل یک محیط شامل محیطی که تحت تیمار زیست‌پالایی قرار می‌گیرد، باشد، می‌توان بررسی را از طریق انجام توالی‌یابی شاتگان[1] در مقیاس وسیع در کتابخانه کوچک DNA انجام داد (دئوتشباوئر و همکاران، ۲۰۰۶). در این مورد، هدف گرفتن تصویری کُلی از زیست‌بوم میکروبی است (نه تمرکز روی ژن‌ها، مسیرها یا موجودات خاص). این روش شامل ایجاد و توالی‌یابی تصادفی انتهای کتابخانه الحاقی کوچک DNA (حدود ۳ تا ۵ کیلو جفت باز) و در ادامه سرهم کردن توالی‌های بعدی به صورت داربستی و کانتیگ به صورت تراشه‌ای است. در این کار، به ویژه سرهم‌کردن ژنوم امری چالش برانگیز است. زیرا مقدار زیادی داده از روش توالی‌یابی شاتگان انباشته شده است و نیز جمعیت محیطی، پویایی بالایی از نظر سرشار بودن و توزیع گونه‌ای و ناهمگنی ژنتیکی درون گونه‌ای دارد (دی‌لانگ، ۲۰۰۵). شایان ذکر است که ترینگ و همکاران (۲۰۰۵) به طور موفقیت‌آمیزی توان متابولیک جوامع میکروبی زمینی و دریایی را با استفاده از داده‌های توالی‌یابی گسترده‌ی سرهم‌بندی نشده، شناسایی و با هم مقایسه کردند. در این روش، هر محیط با یک اثر انگشت خاص یا برچسب ژن محیطی (توالی کوتاهی از DNA که دارای قطعاتی از ژن‌های عملکردی است)، شناسایی می‌شوند. با وجود اینکه روش توالی‌یابی شاتگان ممکن است در مقایسه با محیط‌های گوناگون ارزشمند باشد، اما روشن نیست چگونه این گونه توالی‌یابی از ژن‌های خاص و عملکردهای مرتبط با آن، به ویژه در جایگاه‌های زیست‌پالایی شده سر در می‌آورد. در واقع هم کتابخانه‌های بزرگ و هم کتابخانه‌های کوچک DNA برتری و کاستی‌هایی دارند (ویتاکر و بَنفیلد، ۲۰۰۶) و ترکیب این روش‌ها (هالام و همکاران، ۲۰۰۴) بهترین راه حل برای افزایش دقت، پوشش و قابلیت اعتماد تلاش‌های مبتنی بر ژنومیک برای شناسایی جوامع میکروبی پیچیده هستند (دی‌لانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

1. Shotgun sequencing approach

۱۸-۳- کاربرد تکنیک‌های مولکولی در جایگاه‌های آلوده برای شناسایی جوامع میکروبی و ارزیابی تجزیه زیستی

عملکرد فرایند زیست‌پالایی و پیش‌بینی نتایج آن نیازمند پایش دقیق و قابل اطمینانِ فعالیت‌های تجزیه زیستی است. در حالت ایده‌آل، لازم است که در زمان واقعی از ابزارهای مناسب برای تعیین رابطه‌ی بین شرایط فیزیکی و شیمیایی جایگاه تحت زیست‌پالایی با ویژگی‌های دینامیکی (انعطاف‌پذیری، ثبات و ...) جوامع میکروبی درگیر در فعالیت‌های تجزیه، استفاده شود. ابزارهای مولکولی که در بخش‌های پیشین شرح داده شدند، به روشنی قادر به پایش و تعیین کمی تغییرشکل زیستی آلاینده‌های مرتبط با موجودات متناظر هستند. افزون بر این، بیشتر این ابزارها معیار پایش توأم در زمان واقعی و حجم بالا را برآورده می‌کنند. به عبارت دیگر، آن‌ها ویژگی‌های پُربروندادد دارند. در شکل ۱۸-۲ ارتباط اجرایی بین راه‌کارهای زیست‌پالایی و جایگاه‌های آلوده با آلاینده‌های خطرناک و فنّاوری‌های مولکولی پُربروندادد برای شناسایی و پایش این جایگاه‌ها آمده است. مطالعات پایلوت و میدانی که از این ابزارها استفاده کرده‌اند، سرعت بالای پیشرفت‌های فنّاورانه که با پروتکل‌های استاندارد تلفیق شده‌اند را منعکس کرده‌اند. اگرچه بیشتر این تکنیک‌ها هنوز در گام‌های آغازین توسعه هستند و نیاز به اعتبارسنجی در مقیاس گسترده دارند، ولی روش‌های مولکولی پُربروندادد پتانسیل زیادی برای پایش کارایی و قابلیت اطمینان طرح‌های زیست‌پالایی دارند.

ما چند نمونه از ویژگی‌های کاربردی این روش‌های مولکولی را برای پایش جایگاه‌های آلوده تحت پالایش و برای کشف ریزجانداران تجزیه‌کننده یا ژن‌های کاتابولیکی جدید ارائه می‌کنیم. در بین این تکنیک‌ها، روش‌های انگشت‌نگاری مانند DGGE، RISA و T-RFLP برای مشخص کردن وضعیت پروژه‌های زیست‌پالایی با موفقیت روزافزون به کار گرفته شده‌اند (اسکاو و هیکس، ۲۰۰۵).

شکل ۱۸-۲ راه‌کارهای زیست‌پالایی در جایگاه‌های آلوده شده با ضایعات خطرناک یا سخت تجزیه شونده با تاکید ویژه بر پتانسیل فنّاوری‌های مولکولی پُربروندا (با قلم سیاه نوشته شده‌اند) برای شناسایی و پایش این جایگاه‌ها. FGA ها: آرایه‌های ژن عملکردی، POA ها: آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی تبارشناختی، CGA ها: آرایه‌های ژنوم جامعه

از ریزآرایه‌ها (آرایه‌های الیگونوکلئوتیدی تبارشـــناختی (POA ها)، آرایه‌های ژن‌های عملکردی (FGA ها) و آرایه‌های ژنوم جامعه (CGA ها)) برای شـــناســـایی تنوع کاتوبولیکی و تبارشـــناختی محیط‌های آلوده استفاده شده است. افزون بر این، آن‌ها این پتانسیل را دارند که تغییرات در ترکیب تبارشناسی جوامع میکروبی یا تغییرات در سطوح بیان ژن کاتابولیکی در طی فرایند زیست‌پالایی را به طور پویایی پایش کنند. برای بررســی تغییرات در سطوح بیان ژن کاتابولیکی، به جای DNA، از RNA محیطی (یا دقیق‌تر cDNA) برای هیبرید شدن با ریزآرایه استفاده می‌شود. در یک نمونه از آرایه تبارشـــناختی که هدف آن شـــناسایی گروه‌های باکتریایی موثر در فعالیت تجزیه زیستی بود، از POA اســتفاده شــد که در آن RNA خاک به طور مســتقیم هیبرید شــد (الفانتروسی و همکاران، ۲۰۰۳). نیوفلد و همکاران (۲۰۰۶) یک آرایه «برچسب توالی ریبوزومی»[1] (RST) برای شناسایی و مقایســه خاک‌های مختلف آلوده به هگزاکلروســیکلوهگزان (HCH) را توســعه دادند. برای این کار، آرایه RST طراحی شد تا فراوان‌ترین فیلوتیپ‌های تکثیر شده با PCR در نمونه‌های خاک را هدف قرار دهد و بنابراین مشــکل حســاســیت نداشــته باشــد. ۱۰۰ مورد از فراوان‌ترین RSTها (یعنی توالی‌های کوتاه ســرشــار از اطلاعاتِ نواحی بسیار متغیر از ژن‌های 16S rRNA باکتریایی) در یک کتابخانه مرکب از ۲۲۹۰ RTS از خاک‌های آلوده و غیرآلوده برای طراحی کاوشــگر انتخاب شــدند. آنالیز نمونه‌های خاک به روش DGGE در کنار آرایه RST، طراحی آرایه مختص زیســتگاه را تایید کرده و نشــان داد که بیشــتر ســیگنال‌های پروب معتبر هســتند. همبســتگی قوی بین غلظت کل HCH و ســیگنال‌های پروب نظیر *پروتئوباکتر*های ناشــناخته و غلظت α–HCH و پروب‌های هدف *اسفینگوموناس* دیده شد.

مســاله اختصــاصــی بودن را با توجه به قابلیت منحنی‌های تجزیه به آسانی می‌توان ارزیابی کرد. برای نمونــه، اِیرز و همکــاران (۲۰۰۶) از این روش بــه طور موفقیــت‌آمیزی برای تمایز تغییر جامعه میکروبی در خــاک آلوده به ۲، ۴، ۶-تری نیتروتولوئن (TNT) با اســـتفاده از POA که rRNA را هدف قرار می‌دهد، اســتفاده کردند. در توسعه جالب‌توجه اخیر فنّاوری ریزآرایه با پتانسیل شناسایی ژن‌های کاتابولیکی، گائو و همکاران (۲۰۰۷) تکثیر RNA کل جامعه[2] (WCRA) را با ریزآرایه‌های ژنوم جامعه ترکیب کرده تا عملکرد جوامع میکروبی را در یک راکتور دنیتریفیکاتور و نمونه‌های آب زیرزمینی با زیســت توده کم که آلوده به حلال‌های آلی، هیدروکربن‌ها، نیترات و اورانیوم بود، پایش کنند. این پژوهش‌گران پیش از آزمایش این پروتکل روی نمونه‌های محیطی، بررســـی کردند که آیا پس از ترکیب WCRA و mRNA ها از چهار نمونه شـــناخته شـــده، می‌توان نمونه شـــاخص برای تکثیر به دست آورد یا خیر. نمونه شاخص خوب با RNAهای الگوی ترکیب شده به دست آمد. اما

1. Ribosomal Sequence Tag
2. Whole-community RNA amplification

این پژوهش‌گران متذکر شده‌اند که احتمالاً آزمون‌های بیشتر با جوامع ساختگی که ساختار پیچیده‌تری دارند، لازم است. سرانجام، ژن‌های بیان شده در راکتور زیستی و سامانه آب زیرزمینی سازگار با عملکرد مورد انتظار این قبیل از سامانه‌ها است. این نتایج نشان می‌دهد که این روش می‌تواند سبب شناسایی قابل اعتماد و جامعِ فعالیت‌های در محل جامعه میکروبی با روش‌های پُربروندادِ شود.

دانش نسبتاً ضعیف ما از مسیرهای تجزیه آلاینده‌هایی که به سختی تجزیه می‌شوند، مانع اجرای راه‌کارهای نوآورانه زیست‌پالایی برای معدنی شدن آن‌ها شده است. بنابراین روش‌های متاژنومیک و توالی‌یابی کل ژنوم به طور پیش‌رونده‌ای برای کشف و شناسایی ریزجانداران و اُپرون‌های کاتابولیکی جدید درگیر در تجزیه آلاینده‌های خطرناک به کار گرفته شده‌اند. برای مثال، سوِاناگا و همکاران (۲۰۰۷) از یک روش متاژنومیک برای بازیابی اُپرون‌های کاتابولیکی ترکیب‌های آروماتیک از لجن فعالِ کارخانه تصفیه پساب زغال‌سنگ استفاده کردند. کتابخانه متاژنومیکی برای جست‌وجوی اکسترادیول دی‌اکسیژناز[1] (EDO) و با استفاده از کتکول[2] به عنوان سوبسترا غربال‌گری شد. در مجموع ۴۳ ژن EDO در کلون‌های مثبت شناسایی شد که بیش از نیمی از این ژن‌ها متعلق به زیرخانواده جدید EDO بود. افزون بر این، آنالیز توالی ژن، بازسازی شجره‌ی تکاملی EDO را امکان‌پذیر ساخت. بوبکری و همکاران (۲۰۰۶) برای نشان دادن پتانسیل متاژنوم‌ها برای ارائه ژن‌های جدید، روشی به نام «فرایند آمیختن DNA متاژنومیک»[3] توسعه دادند. هدف آن‌ها ارزیابی پتانسیل متاژنوم‌های محیطی برای تهیه قطعات ژنی مناسب جهت ساخت ژن‌های جدید تحت شرایط فشارهای محیطی مانند حضور آلاینده‌ها و مواد زیست‌بیگانه بود. سازوکاری که به نظر می‌رسد در تکامل ژنومیکی باکتری‌ها در طبیعت نقش داشته باشد، انتقال افقی قطعات ژن و آمیختن آن در ژنوم‌های میکروبی است. پژوهش‌گران این فرآیند را در آزمایشگاه به طور موفقیت‌آمیزی بازسازی کردند. آن‌ها ژن تجزیه کننده‌ی آفت‌کش *linA*، را از متاژنوم خاک بدون لیندان[4] که توالی مشابه یا نظیر *linA* داشت، شناسایی کردند. این مطالعه نشان داد که امکان دارد قطعات DNA از کل جامعه میکروبی برای ایجاد ژن‌های جدید که قادر به تجزیه آلاینده‌ها باشند، فراهم شود.

1. Extradiol dioxygenases
2. Catechol
3. Metagenomic DNA shuffling process
4. Lindane

گاهی حتی نتایج منفی از غربال کتابخانه متاژنوم که دلیل آن ناسازگاری موجود میزبان است، هم می‌تواند ارزشمند باشد. ما اخیراً این موضوع را در مورد گنجایش نیترات‌زدایی TNT توسط *ایشریشیا کولای* که میزبان برتر است نشان دادیم. وقتی که ما یک کتابخانه متاژنوم برای فعالیت نیترات‌زدایی با استفاده از DNA خاکی که در گذشته با این ماده منفجره با تجزیه‌شوندگی سخت آلوده شده بود، ایجاد کردیم، این توان را در این باکتری مشاهده کردیم (استنوئیت و همکاران، ۲۰۰۶). در این زمینه، اخیراً با استفاده از کاوش ریزآرایه که در بالا اشاره شد (اِیرز و همکاران، ۲۰۰۶) و تکنیک انگشت‌نگاری (جورج و همکاران، ۲۰۰۸) دیدگاه‌های ارزشمندی درباره‌ی تغییر ساختار جامعه میکروبی در پیِ آلودگی TNT به دست آمده است.

۱۸-۴- نتیجه‌گیری

به طور کلی، اگرچه ابزارهای مولکولی با فراهم کردن دسترسی مستقیم به میکروب‌های محیطی بدون نیاز به کشت آن‌ها، انقلابی در زمینه بوم‌شناسی میکروبی ایجاد کرده‌اند، اما پتانسیل واقعی اجرایی آن‌ها تنها در زمینه زیست‌پالایی بوده است. امروزه، انتظار می‌رود این فنّاوری‌ها کشف فعالیت‌های کاتابولیکی جدید را تقویت کنند و اطلاعات کمی و به هنگام برای مدیریت و پاک‌سازی جایگاه‌های آلوده و زهاب آن‌ها را از منظر توسعه پایدار فراهم کنند.

منابع

Abulencia CB, Wyborski DL, Garcia JA, Podar M, Chen W, Chang SH, Watson D, Brodie EL, Hazen TC, Keller M (2006) Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. Appl Environ Microbiol 72:3291–3301.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59:143–169.

Ashby MN, Rine J, Mongodin EF, Nelson KE, Dimster-Denk D (2007) Serial analysis of rRNA genes and the unexpected dominance of rare members of microbial communities. Appl Environ Microbiol 73:4532–4542.

Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K (2005) Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. J Microbiol Meth 61:399–412.

Binga EK, Lasken RS, Neufeld JD (2008) Mini-review: something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. ISME J 2:233–41.

Boubakri H, Beuf M, Simonet P, Vogel TM (2006) Development of metagenomic DNA shuffling for the construction of a xenobiotic gene. Gene 375:87–94.

Chandler DP, Jarrell AE, Roden ER, Golova J, Chernov B, Schipma MJ, Peacock AD, Long PE (2006) Suspension array analysis of 16S rRNA from Fe- and SO_4^{2-} -reducing bacteria in uranium-contaminated sediments undergoing bioremediation. Appl Environ Microbiol 72:4672–4687.

Cowan D, Meyer Q, Stafford W, Muyanga S, Cameron R, Wittwer P (2005) Metagenomic gene discovery: past, present and future. Trends Biotechnol 23:321–329.

Daffonchio D (2005) Molecular tools to track complex microbial populations in polluted environments and during reclamation. In: Fava F, Canepa P (eds) Innovative approaches to the bioremediation of contaminated sites, soil remediation series Nº6. INCA, Venice, Italy (ISBN: 88-88214-33-X).

Daniel R (2005) The metagenomics of soil. Nat Rev Microbiol 3:470–478.

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M,

Lasken RS (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci USA 99:5261–5266.

DeLong EF (2005) Microbial community genomics in the ocean. Nat Rev Microbiol 3:459–469.

DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard N-U, Martinez A, Sullivan MB, Edwards R, Brito BR, Chisholm SW, Karl DM (2006) Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. Science 311:496–503.

Deutschbauer AM, Chivian D, Arkin AP (2006) Genomics for environmental microbiology. Curr Opin Biotechnol 17:229–235.

El Fantroussi S, Agathos SN (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Curr Opin Microbiol 8:268–275.

El Fantroussi S, Urakawa H, Bernhard AE, Kelly JJ, Noble PA, Smidt H, Yershov GM, Stahl DA (2003) Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. Appl Environ Microbiol 69:2377–2382.

Erwin DP, Erickson IK, Delwiche ME, Colwell FS, Strap JL, Crawford RL (2005) Diversity of oxygenase genes from methane- and ammonia-oxidizing bacteria in the Eastern Snake River plain aquifer. Appl Environ Microbiol 71:2016–2025.

Eyers L, Agathos SN, El Fantroussi S (2004a) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as a fingerprinting tool for analyzing microbial communities in contaminated environments. In: Spencer JFT, Ragout de Spencer AL (eds) Environmental microbiology — methods and protocols. Humana Press, Totowa, pp 407–417.

Eyers L, George I, Schuler L, Stenuit B, Agathos SN, El Fantroussi S (2004b) Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. Appl Microbiol Biotechnol 66:123–130.

Eyers L, Smoot JC, Smoot LM, Bugli C, Urakawa H, McMurry Z, Siripong S, El Fantroussi S, Lambert P, Agathos SN, Stahl DA (2006) Discrimination of shifts in a soil microbial community associated with TNT-contamination using functional ANOVA of 16S rRNA hybridized to oligonucleotide microarrays. Environ Sci Technol 40:5867–5873.

Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. Appl Environ. Microbiol 65:4630–4636.

Gao H, Yang ZK, Gentry TJ, Wu L, Schadt CW, Zhou J (2007) Microarray-based analysis of microbial community RNAs by whole-community RNA amplification. Appl Environ Microbiol 73:563–571.

George I, Eyers L, Stenuit B, Agathos SN (2008) Effect of 2,4,6-trinitrotoluene on soil bacterial communities. J Ind Microbiol Biotechnol 35:225–236.

Gentry TJ, Wickham GS, Schadt CW, He Z, Zhou J (2006) Microarray applications in microbial ecology research. Microb Ecol 52:159–175.

Golyshin PN, Martins Dos Santos VAP, Kaiser O, Ferrer M, Sabirova YS, Lünsdorf H, Chernikova TN, Golyshina OV, Yakimov MM, Pühler A, Timmis KN (2003) Genome sequence completed of Alcanivorax borkumensis, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. J Biotechnol 106:215–220.

Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, Detter JC, Rokhsar D, Richardson PM, DeLong EF (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. Science 305:1457–1462.

Handelsman J (2005) Sorting out metagenomes. Nature Biotechnol 23:38–39.

Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IR, Garrett VM, Hawkins SA (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environ Sci Technol 37:343–351.

He Z, Deng Y, Van Nostrand JD, Wu L, Hemme CL, Liebich J (2007a) GeoChip 3.0: Further development and applications of functional gene arrays (FGAs) for analysis of microbial communities. 107th ASM General Meeting, Toronto, ON, Canada, poster N178.

He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC (2007b) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. ISME J 1:67–77.

Inglis GD, Kalischuk LD (2004) Direct quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter lanienae in feces of cattle by real-time quantitative PCR. Appl Environ Microbiol 70:2296–2306.

Kube M, Beck A, Zinder SH, Kuhl H, Reinhardt R, Adrian L (2005) Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium Dehalococcoides species strain CBDB1. Nat Biotechnol 23:1269–1273.

Lorenz P, Eck J (2005) Metagenomics and industrial applications. Nat Rev Microbiol 3:510–516.

Marsh TL, Saxman P, Cole J, Tiedje J (2000) Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. Appl Environ Microbiol 66:3616–3620.

Neufeld JD, Mohn WW, de Lorenzo V (2006) Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. Environ Microbiol 8:126–140.

Paerl HW, Steppe TF (2003) Scaling up: the next challenge in environmental microbiology. Environ Microbiol 5:1025–1038.

Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 64:3724–3730.

Ram RJ, VerBerkmoes NC, Thelen MP, Tyson GW, Baker BJ, Blake RC (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. Science 308:1915-1920.

Rittmann BE, Hausner M, Löffler F, Love NG, Muyzer G, Okabe S, Oerther DB, Peccia J, Raskin L, Wagner M (2006) A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. Environ Sci Technol 40:1096–1103.

Robertson LA, Steer BA (2004) Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. Curr Opin Chem Biol 8:141–149.

Scow KM, Hicks KA (2005) Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. Curr Opin Biotechnol 16:246–253.

Stenuit B, Eyers L, El Fantroussi S, Agathos SN (2005) Promising strategies for the mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. Rev Environ Sci Biotechnol 4:39–60.

Stenuit B, Eyers L, Rozenberg R, Habib-Jiwan J-L, Agathos SN (2006) Aerobic growth of Escherichia coli on 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)

as sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. Appl Environ Microbiol 72:7945–7948.

Suenaga H, Ohnuki T, Miyazaki K (2007) Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. Environ Microbiol 9:2289–2297.

Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl Environ Microbiol 62:625–630.

Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC, Bork P, Hugenholtz P, Rubin EM (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. Science 308:554–557.

van der Lelie D, Lesaulnier C, McCorkle S, Geets J, Taghavi S, Dunn J (2006) Use of single-point genome signature tags as a universal tagging method for microbial genome surveys. Appl Environ Microbiol 72:2092–2101.

Wagner M, Nielsen PH, Loy A, Nielsen JL, Daims H (2006) Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. Curr Opin Biotechnol 17:83–91.

Whitaker RJ, Banfield JF (2006) Population genomics in natural microbial communities. Trends Ecol Evol 21:508–516.

Wick LM, Rouillard JM, Whittam TS, Gulari E, Tiedje JM, Hashsham SA (2006) On-chip nonequilibrium dissociation curves and dissociation rate constants as methods to assess specificity of oligonucleotide probes. Nucleic Acids Res 34:e26.

Wu L, Thompson DK, Li G, Hurt RA, Tiedje JM, Zhou J (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. Appl Environ Microbiol 67:5780–5790.

Wu L, Liu X, Schadt CW, Zhou J (2006) Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. Appl Environ Microbiol 72:4931–4941.

Yu C-P, Ahuja R, Sayler GS, Chu K-H (2005) Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia. Appl Environ Microbiol 71:1433–1444.

Yu C-P, Chu, K-H (2005) A quantitative assay for linking microbial community function and structure of a naphthalene-degrading microbial consortium. Environ Sci Technol 39:9611–9619.

Zhou J (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. Curr Opin Microbiol 6:288–294.

Ajay Singh • Ramesh C. Kuhad Owen P. Ward Editors

Advances in Applied Bioremediation

Editors Dr. Ajay Singh Dr. Ramesh C. Kuhad Department of Biology Department of Microbiology University of Waterloo University of Delhi South Campus Waterloo, Ontario N2L 3G1 New Delhi – 110021 Canada India ajasingh@sciborg.uwaterloo.ca kuhad@hotmail.com
Dr. Owen P. Ward Professor of Microbial Biotechnology Department of Biology University of Waterloo Waterloo, Ontario N2L 3G1 Canada opward@sciborg.uwaterloo.ca
Soil Biology ISSN: 1613–3382

ISBN: 978-3-540-89620-3 DOI 10.1007/978-3-540-89621-0	e-ISBN: 978-3-540-89621-0

Springer Dordrecht Heidelberg London New York Library of Congress Control Number: 2008944089
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009
This work is subject to copyright. All rights are reserved, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilm or in any other way, and storage in data banks. Duplication of this publication or parts thereof is permitted only under the provisions of the German Copyright Law of September 9, 1965, in its current version, and permission for use must always be obtained from Springer. Violations are liable to prosecution under the German Copyright Law.
The use of general descriptive names, registered names, trademarks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.
Cover design: SPi Publisher Services
Printed on acid-free paper Springer is part of Springer Science+Business Media (www.springer.com)

University of Guilan Press

Advances in Applied Bioremediation

By:

Ajay Singh **Ramesh C. Kuhad** **Owen P. Ward**

Translated by:

Nasrin Ghorbanzadeh, Ph. D
Mohammad Bagher Farhangi Rasti, Ph. D