تغییرات فرایندهای میکروبی و آنزیمی چرخه‌ی نیتروژن در خاک‌های آلوده به نفت

مصطفی ایلخانی پور[۱]، احمدعلی پوربابائی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران؛

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*E-mail: Pourbabaei@ut.ac.ir

چکیده

ورود هیدروکربن‌های نفتی به خاک تأثیرات قابل توجهی بر ویژگی‌های زیستی و شیمیایی خاک دارد که بررسی آن‌ها برای درک بهتر توانایی خاک در مقابله با آلودگی‌ها ضروری است. چرخه‌ی میکروبی کربن در خاک، به‌عنوان فرایندی کلیدی در تجزیه‌ی آلاینده‌های نفتی، ارتباط تنگاتنگی با چرخه‌ی نیتروژن دارد. یکی از مهم‌ترین اثرات سمیت هیدروکربن‌های نفتی، ایجاد تغییرات در مسیرهای متابولیک چرخه‌ی نیتروژن یعنی تثبیت نیتروژن، نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون و همچنین اختلال در تعادل و فراهمی اشکال آلی و معدنی نیتروژن در خاک است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آلاینده‌های نفتی، مقادیر آمونیوم و نیترات موجود در خاک کاهش می‌یابد. کاهش چشمگیر فراوانی و بیان ژن‌های nifD و nifK که در تثبیت نیتروژن نقش دارند، در خاک‌های با سطوح آلودگی بالا نسبت به خاک‌هایی با آلودگی کمتر مشاهده شده است. همچنین رقابت بین باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن‌های نفتی و باکتری‌های نیتریفایر بر سر منابع آمونیاک موجب مهار فرایندهای اکسیداسیون و نیتریفیکاسیون آمونیاک شده، درحالی که متابولیسم هیدروکربن‌ها باعث تقویت فرایند دنیتریفیکاسیون می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت که مطالعات متاژنومیک در بررسی جامعه‌ی میکروبی خاک و فراوانی ژن‌های عملکردی مرتبط با چرخه‌ی نیتروژن در شرایط آلودگی نفتی می‌تواند به شناخت بهتر این چرخه کمک کرده و در مدیریت پاکسازی خاک‌های آلوده با استفاده از ظرفیت جامعه‌ی میکروبی آن بسیار مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: تثبیت نیتروژن، دنیتریفیکاسیون، نیتریفیکاسیون، هیدروکربن‌های نفتی

مقدمه

نفت یکی از منابع کلیدی انرژی در سطح جهانی است. فرایندهایی نظیر استخراج، تصفیه و حمل و نقل نفت و مشتقات آن در سرتاسر جهان، منجر به ورود هیدروکربن‌های نفتی به خاک می‌شود (Wu et al., 2014). آلودگی نفتی فعالیت‌های متابولیک میکروارگانیسم‌های خاک را تغییر می‌دهد (Gao et al., 2022). نیتروژن یک عنصر غذایی مهم است. یکی از مهم‌ترین نقش‌های نیتروژن در خاک‌های آلوده به نفت، اهمیت این عنصر به‌عنوان یک ماده مغذی معدنی محدودکننده برای تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌های نفتی در خاک است. در دسترس بودن نیتروژن با چرخه‌ی نیتروژن در خاک که شامل مجموعه‌ای از مسیرهای مهم بیوژئوشیمیایی است که توسط آن اشکال مختلف نیتروژن به واسطه‌ی جوامع میکروبی تبدیل می‌شوند، ارتباط نزدیکی دارد. بنابرین، درک بهتر چرخه‌ی نیتروژن و سازگاری با محیط آلوده به نفت، با هدف ارتقای کارایی استفاده از نیتروژن در تجزیه‌ی زیستی هیدروکربن‌های نفتی بسیار قابل توجه است (Gao et al., 2021). همچنین تأثیر خصوصیات خاک مانند بافت، رطوبت، pH و EC بر متابولیسم هیدروکربن‌های نفتی و برهمکنش آن با چرخه‌ی نیتروژن را نباید نادیده گرفت (Liu et al., 2024). تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌های نفتی با چرخه‌ی نیتروژن در خاک تعامل نزدیکی دارد (Kong et al., 2024). از اثرات منفی برخی از آلاینده‌های نفتی مانند فنانترن (Phenanthrene) بر منابع نیتروژن خاک، می‌توان به کاهش فعالیت‌های زیستی مؤثر بر حاصلخیزی خاک، مانند همزیستی باکتری‌های دی‌ازوتروف با گیاهان لگوم اشاره کرد که با کاهش تعداد گرهک‌ها در ریشه گیاه، باعث کاهش بازده تثبیت نیتروژن در خاک می‌شود (Pourbabaee et al., 2021). افزایش غلظت هیدروکربن‌های نفتی باعث افزایش میزان مصرف نیتروژن توسط باکتری‌های هتروتروف خاک می‌شود (Liu et al., 2024). سطوح بالای آلودگی نفتی در خاک با افزایش غلظت آمونیوم و کاهش غلظت نیتریت (NO_2^-) و نیترات، اثرات شدیدی بر خواص شیمیایی خاک دارد (Kong et al., 2024). از آنجایی که فرایند نیتریفیکاسیون[1] عمدتاً توسط هتروتروف‌ها انجام می‌شود که نسبت به نیتریفایرها در برابر سمیت هیدروکربن‌های نفتی مقاوم‌تر هستند، مهار نیتریفیکاسیون تبدیل نیتروژن به فرم نیتراتی را کاهش داده و فراهمی آمونیاک را افزایش می‌دهد که می‌تواند باعث افزایش رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت شود (Urakawa et al., 2019). هدف این مقاله، مرور اثر هیدروکربن‌های نفتی بر فرایندهای حیاتی چرخه‌ی نیتروژن در خاک و همچنین بررسی تغییرات فعالیت‌های میکروبی در مراحل مختلفی همچون تثبیت نیتروژن[2]، نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون[3] است. به‌علاوه، تأثیر آلودگی نفتی بر سطوح آمونیوم و نیترات در خاک بررسی خواهد شد. همچنین، تحلیل متاژنومیک جامعه میکروبی به‌منظور ارزیابی تغییرات در فراوانی و بیان ژن‌های دخیل در مراحل گوناگون چرخه‌ی نیتروژن در شرایط آلودگی نفتی انجام می‌شود که به درک بهتر تأثیرات آلودگی بر اکوسیستم‌های خاکی و بهبود شیوه‌های مدیریت آلودگی کمک کند.

تغییرات فرایند تثبیت نیتروژن در خاک تحت تأثیر آلودگی نفتی

افزایش میزان آلاینده‌ی نفتی در خاک، میزان تثبیت NH_4^+ را به دو صورت افزایش می‌دهد: ۱) آلودگی نفتی تخلخل خاک و تماس بین میکروارگانیسم‌ها و نیتروژن آلی در خاک را کاهش می‌دهد. ۲) میکروارگانیسم‌های متحمل به هیدروکربن‌های نفتی تمایل به جذب و استفاده از NH_4^+ برای بقای خود دارند (Liu et al., 2023). نفت در خاک از عملکرد آنزیم نیتروژناز جلوگیری می‌کند و در نتیجه سنتز پروتئین را مختل می‌کند (John et al., 2011). کاهش غلظت

[1] Nitrification
[2] Nitrogen fixation
[3] Denitrification

نیتروژن خاک در طول فرایند و پس از تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی باعث افزایش تثبیت نیتروژن در خاک می‌شود (Urakawa et al., 2019). متاژنومیکس عملکردی نشان داده که پتانسیل ژنتیکی تجزیه‌ی زیستی هیدروکربن‌های نفتی و همچنین احیای نیترات غیرجذبی به آمونیوم (DNRA[۴]) و تثبیت N با افزایش میزان آلودگی نفتی فعال می‌شود. تجزیه‌ی زیستی هیدروکربن‌های نفتی با انتقال الکترون‌ها به نیترات/نیتریت با فرایند DNRA همراه است. آمونیوم انباشته شده از طریق فرآیندهای تثبیت فرم معدنی N به فرم‌های آلی و DNRA می‌تواند توسط هتروتروف‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت از طریق تثبیت فرم معدنی N به فرم‌های آلی مورد استفاده قرار گیرد (Kong et al., 2024). زیرواحدهای آنزیم نیتروژناز توسط ژن‌های nifH، nifD و nifK کدگذاری می‌شوند (van Dorst et al., 2014). ژن nifH گسترده‌ترین نشانگر توالی‌یابی و مورد استفاده برای تثبیت نیتروژن است. میزان بیان ژن‌های nifD و nifK (ژن‌های دخیل در فرایند تثبیت نیتروژن) در خاک‌های دارای آلودگی نفتی شدید نسبت به خاک‌های غیرآلوده کمتر است (Gao et al., 2022).

تأثیر آلودگی نفتی بر فرایندهای نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون در خاک

با افزایش سطوح آلودگی در خاک، تنوع و فراوانی گونه‌های باکتریایی و میزان بیان ژن‌های عملکردی دخیل در فرایند نیتریفیکاسیون به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. اکسیداسیون آمونیوم به نیتریت و به‌دنبال آن اکسیداسیون نیتریت به نیترات فرایندهای حیاتی در چرخه‌ی نیتروژن خاک هستند. مهار گونه‌های نیتریفایر و کاهش تعداد رونوشت‌های باکتریایی ژن amoA (کد کننده‌ی زیرواحد آلفا در آنزیم آمونیاک مونواکسیژناز که اولین آنزیم در اکسیداسیون آمونیاک)، نیتریفیکاسیون را به‌عنوان یک فرایند حساس برای جوامع میکروبی تحت تأثیر آلودگی نفتی تبدیل می‌کند (Schafer et al., 2007). باکتری‌های متعلق به جنس *Nitrobacter* نقش مهمی در مرحله دوم نیتریفیکاسیون که در آن نیتریت به نیترات اکسید می‌شود دارند. این اکسیدکننده‌های نیتریت شیمولیتوتروف و حساس به هیدروکربن‌های نفتی هستند (Fuller et al., 2004). در حضور نفت، نیتریفایرها و باکتری‌های اکسیدکننده‌ی آمونیاک ۱۰۰ برابر حساس‌تر از هتروتروف‌های معمولی خاک هستند. نیتریفیکاسیون توسط آلودگی هیدروکربنی مختل می‌شود که منجر به کاهش قابل توجه ذخایر نیترات می‌شود. افزایش فعالیت هتروتروف‌ها باعث کاهش سطح اکسیژن در خاک و افزایش نیاز به اکسیژن موجود در نیترات می‌شود. احیای غیرجذبی نیترات به آمونیوم رخ می‌دهد. افزایش فراوانی و بیان ژن nirA ممکن است به‌علت افزایش زیست‌توده‌ی میکروبی باشد (Lu et al., 2012). همچنین افزایش بیان ژن nrfA نشان داده که باکتری‌های دارای توانایی احیای غیرجذبی نیترات می‌توانند از نفت خام به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند (Ribeiro et al., 2018).

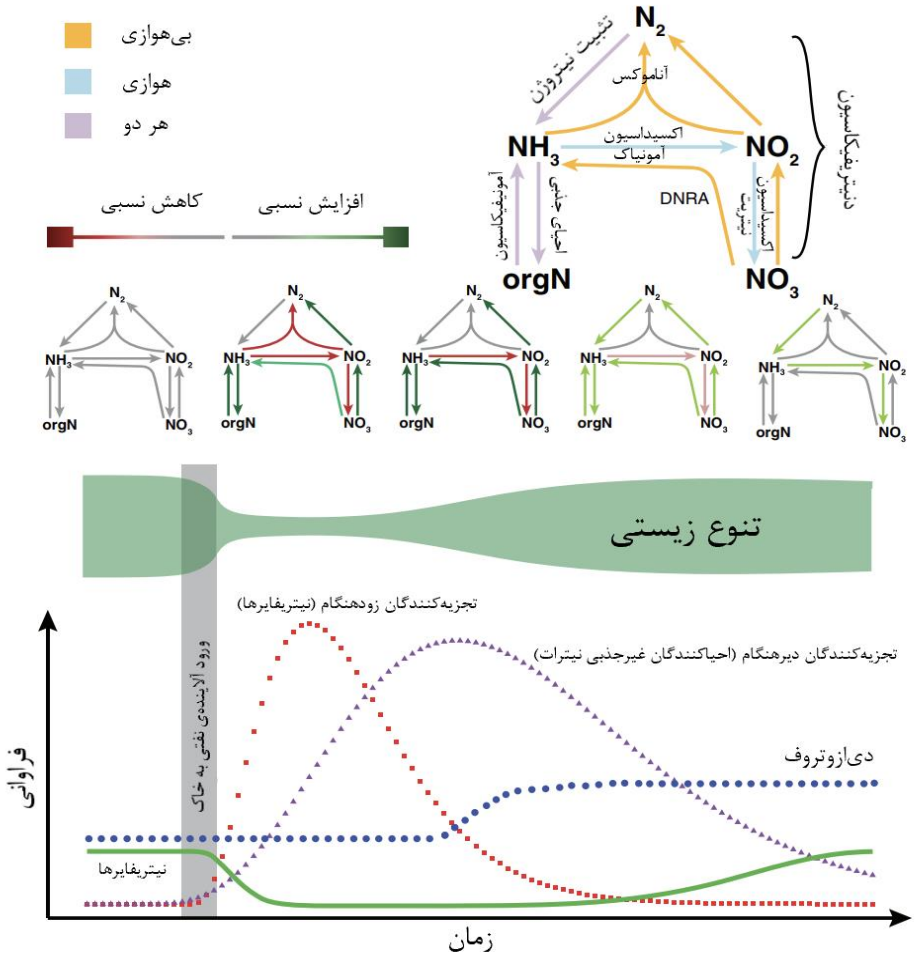
مطالعات Liu و همکاران (۲۰۲۴) بر برهمکنش هم‌افزایی ژن‌های عملکردی و تجزیه و تحلیل همبستگی اسپیرمن نشان می‌دهد که مقادیر بالای آلودگی نفتی (بیش از ۲×۱۰^{۴} میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک) با فراوانی ژن‌های تثبیت نیتروژن nifH و nifK همبستگی منفی دارد. با این حال، در خاک‌های مرتعی، غلظت‌های پایین‌تر نفت تجمع نیتروژن را تسهیل می‌کند. یک همبستگی مثبت بین فراوانی ژن‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت و ژن‌های دنیتریفیکاسیون (bphAa در مقابل nirD، todC در مقابل nirS، و nahB در مقابل nosZ) مشاهده شد، درحالی که یک همبستگی منفی بین alkB (ژن‌های تجزیه‌ی آلکان) و amo (ژن‌های اکسیداسیون آمونیاک) مشاهده شد.

John و همکاران (2011) در مطالعات خود مشاهده کردند که سطوح آمونیوم و نیترات در خاک غیرآلوده بالا بود اما با افزایش سطح آلودگی نفتی، مقادیر آمونیوم و نیترات کاهش یافت. مقادیر نیتریت در خاک آلوده به نفت احتمالاً به‌دلیل

[4] Dissimilatory nitrate reduction to ammonium

کاهش تعداد باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، از 5×10^{6} CFU/g در خاک غیرآلوده به 9×10^{5} CFU/g در خاک با سطح آلودگی ۵ درصد و 2×10^{5} CFU/g در خاک با سطح آلودگی ۲۰ درصد قابل اندازه‌گیری نبود.

فراوانی ژن‌های دخیل در دنیتریفیکاسیون، نیتریفیکاسیون و تثبیت N به‌طور قابل توجهی در خاک آلوده کاهش می‌یابد (Gao et al., 2022). درحالی که مطالعات دیگر نشان داده که در خاک‌های دارای سطوح بالای آلودگی، به واسطه‌ی فراوان بودن ژن‌های کدکننده‌ی نیتروژناز، تثبیت N افزایش یافته است (Kong et al., 2024). دلیل آن می‌تواند این باشد که وجود محدودیت نیتروژن در خاک آلوده به نفت، می‌تواند باعث انتخاب گونه‌های دارای توانایی تثبیت نیتروژن شود تا جذب N را برآورده و نسبت کربن به نیتروژن در زیست‌توده‌ی میکروبی را حفظ کند. در شکل ۱، تأثیر حضور آلاینده‌های نفتی بر فرایندهای اصلی چرخه‌ی نیتروژن در خاک بطور خلاصه نشان داده شده است (Urakawa et al., 2019).



شکل ۱- تأثیر آلاینده‌های نفتی بر مراحل مختلف چرخه‌ی نیتروژن

نتیجه‌گیری

ورود هیدروکربن‌های نفتی به خاک در غلظت‌های بالا که باعث بروز آلودگی در خاک می‌شود می‌تواند ساختار جامعه‌ی میکروبی خاک را تغییر دهد و همچنین فرایندهای کلیدی چرخه‌ی N مانند تثبیت نیتروژن، نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون را تغییر دهد که این امر سبب برهم خوردن تعادل این عنصر در خاک می‌شود. مطالعات نشان داده که در خاک‌های دارای سطوح بالای آلاینده‌های نفتی غلظت NO_3^-، NO_2^- به‌طور معنی‌داری کاهش و غلظت NH_4^+ به‌طور

معنی‌داری افزایش می‌یابد. این بررسی نشان داد که سطوح بالای آلودگی نفتی در خاک باعث تجمع ژن‌های تجزیه‌کننده ی نفت و مهار اکسیداسیون آمونیاک و نیتریفیکاسیون می‌شود. به‌طوری که ژن‌های دخیل در تثبیت زیستی نیتروژن توسط باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن نظیر ازتوباکتر و همچنین ژن‌های دخیل در فرایند نیتریفیکاسیون مهار و در مقابل بیان ژن‌های دخیل در دنیتریفیکاسیون افزایش می‌یابد. تحلیل متاژنومیک جوامع باکتریایی و بررسی فراوانی ژن‌های عملکردی نیتروژن در شرایط آلودگی نفتی، نقش مهمی در درک و مدیریت چرخه‌ی نیتروژن در خاک دارد و می‌تواند به بهره‌گیری از توانایی‌های جامعه‌ی میکروبی برای اصلاح آلودگی نفتی در خاک با توجه به ارتباط و تأثیر آن بر چرخه‌ی نیتروژن کمک کند.

فهرست منابع

van Dorst, J., Siciliano, S. D., Winsley, T., Snape, I., & Ferrari, B. C. (2014). Bacterial targets as potential indicators of diesel fuel toxicity in subantarctic soils. Applied and environmental microbiology, 80(13), 4021-4033.

Fuller, C., Bonner, J., Page, C., Ernest, A., McDonald, T., & McDonald, S. (2004). Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. Environmental Toxicology and Chemistry, 23(12), 2941-2949.

Gao, H., Wu, M., Liu, H., Xu, Y., & Liu, Z. (2022). Effect of petroleum hydrocarbon pollution levels on the soil microecosystem and ecological function. Environmental Pollution, 293, 118511.

Gao, Y., Du, J., Bahar, M. M., Wang, H., Subashchandrabose, S., Duan, L., ... & Naidu, R. (2021). Metagenomics analysis identifies nitrogen metabolic pathway in bioremediation of diesel contaminated soil. Chemosphere, 271, 129566.

John, R. C., Itah, A. Y., Essien, J. P., & Ikpe, D. I. (2011). Fate of nitrogen-fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 87, 343-353.

Kong, L., Xu, T., Wang, Z., Wen, X., Jiao, Z., & Liu, J. (2024). Metagenomic analysis of petroleum biodegradation coupled to specific N-cycling process in oil-contaminated soil. Applied Soil Ecology, 193, 105144.

Liu, H., Wu, M., Gao, H., Gao, J., & Wang, S. (2023). Application of 15N tracing and bioinformatics for estimating microbial-mediated nitrogen cycle processes in oil-contaminated soils. Environmental Research, 217, 114799.

Liu, Q., He, W., Zhang, W., Wang, L., & Tang, J. (2024). Metagenomic analysis reveals the microbial response to petroleum contamination in oilfield soils. Science of The Total Environment, 912, 168972.

Lu, Z., Deng, Y., Van Nostrand, J. D., He, Z., Voordeckers, J., Zhou, A., ... & Zhou, J. (2012). Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. The ISME Journal, 6(2), 451-460.

Pourbabaee, A. A., Khazaei, M., Alikhani, H. A., & Emami, S. (2021). Root nodulation of alfalfa by Ensifer meliloti in petroleum contaminated soil. Rhizosphere 17: 100305.

Ribeiro, H., de Sousa, T., Santos, J. P., Sousa, A. G., Teixeira, C., Monteiro, M. R., ... & Magalhães, C. (2018). Potential of dissimilatory nitrate reduction pathways in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Chemosphere, 199, 54-67.

Schafer, A. N., Snape, I., & Siciliano, S. D. (2007). Soil biogeochemical toxicity end points for sub-Antarctic islands contaminated with petroleum hydrocarbons. Environmental Toxicology and Chemistry, 26(5), 890-897.

Urakawa, H., Rajan, S., Feeney, M. E., Sobecky, P. A., & Mortazavi, B. (2019). Ecological response of nitrification to oil spills and its impact on the nitrogen cycle. Environmental microbiology, 21(1), 18-33.

Wu, B., Lan, T., Lu, D., & Liu, Z. (2014). Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination. Environmental Science: Processes & Impacts, 16(6), 1501-1509.

Zhao, Y., Chen, W., & Wen, D. (2020). The effects of crude oil on microbial nitrogen cycling in coastal sediments. *Environment international*, *139*, 105724.

Changes in microbial and enzymatic processes of the nitrogen cycle in oil-contaminated soils

Mostafa Eilkhani Pour[1], Ahmad Ali Pourbabaee[2]*
1- M.Sc. student in Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculties of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran;
2- Professor, Department of Soil Science, Faculties of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,
*E-mail: Pourbabaei@ut.ac.ir

Abstract
The entry of petroleum hydrocarbons into soil has significant effects on the biological and chemical properties of soil, the study of which is essential for a better understanding of the soil's ability to cope with pollution. The microbial carbon cycle in soil, as a key process in the decomposition of petroleum pollutants, is closely related to the nitrogen cycle. One of the most important effects of petroleum hydrocarbon toxicity is the creation of changes in the metabolic pathways of the nitrogen cycle, namely nitrogen fixation, nitrification and denitrification, as well as disruption of the balance and availability of organic and inorganic forms of nitrogen in soil. Studies show that with increasing concentrations of petroleum pollutants, the amounts of ammonium and nitrate in soil decrease. A significant decrease in the abundance and expression of the nifD and nifK genes, which play a role in nitrogen fixation, has been observed in soils with high levels of pollution compared to soils with less pollution. Also, competition between hydrocarbon-degrading bacteria and nitrifying bacteria for ammonia resources inhibits ammonia oxidation and nitrification processes, while hydrocarbon metabolism enhances denitrification. It can be concluded that metagenomic studies in investigating the soil microbial community and the abundance of functional genes related to the nitrogen cycle under oil pollution conditions can help to better understand this cycle and be very effective in managing the cleanup of contaminated soils using the capacity of its microbial community.

Keywords: Nitrogen fixation, denitrification, nitrification, petroleum hydrocarbons