Isolation and identification α-Naphthol-degrading bacteria from oil-contaminated soils of Masjed-e-Soleyman

Soheil Rahmatabadi
M.Sc. in Microbiology, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran, s.s_r64@yahoo.com
Mohammad Roayaei Ardakani *
Professor of Microbiology, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran, roayaei_m@yahoo.com
Arash Mouradzadegan
Associate Professor of Organic Chemistry, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran, arash_m@scu.ac.ir
Bahram Alizadeh
Associate Professor of Oil Geology, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran, alizadeh@scu.ac.ir

Archive of SID

Abstract

Introduction: α-Naphthol is a two-ring aromatic hydrocarbon that is a toxic compound for all organisms in different ecosystems. Bioremediation technology for remediating PAH-contaminated sites has been proposed to be an efficient, economical and versatile alternative compared with physicochemical methods.

Materials and Methods: In this study, the basal salt medium was prepared and then α-Naphthol was added with the concentration of 100ppm. α-Naphthol was a sole source of carbon for the growth of bacteria. Eventually, the medium was inoculated with the soil samples collected from polluted region and incubated for six weeks. Bacteria were isolated using double-layer BSM-agar containing the α-naphthol concentration of 200ppm. The degradation rate of α-naphthol and the other PAHs were determined using HPLC and the effective isolate was finally identified using biochemical and molecular methods.

Results: In this study, two isolates (N1 and N2) were isolated that were able to utilize α-Naphthol as a sole source of carbon. The isolate N1 could degrade α-naphthol by 80.5%. Moreover, it was effectively able to degrade the other PAHs than the isolate N2, therefore, it was selected as an efficient isolate. The isolate N1 was identified as *Psuedomonas putida* UW4 with respect to its 16S rDNA sequence and using biochemical tests.

Discussion and conclusion: The isolate N1 could degrade α-naphthol by 80.5% from BSM medium at 30° C, pH 7.0 and the α-naphthol concentration of 100ppm in fifteen days of incubation. According to the results, the isolate N1 can remove a large amount of the α-naphthol from BSM medium under the mentioned conditions and it is possible that under a similar situation the isolate N1 can remove a large amount of α-naphthol.

Key words: α-Naphthol, *Psuedomonas putida*, PAHs, Masjed-e-Soleyman

* Corresponding author
Received: March 6, 2014 / **Accepted:** May 27, 2017

www.SID.ir

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۷۵- ۸۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۶

جداسازی، شناسایی و بررسی میزان تجزیه زیستی باکتری‌های تجزیه‌کننده آلفانفتول از خاک‌های آلوده به نفت مسجدسلیمان

سیدسهیل رحمت‌آبادی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، s.s_r64@yahoo.com
محمدرعایی اردکانی *: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، roayaei_m@yahoo.com
آرش مرادزادگان: دانشیار شیمی آلی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، arash_m@scu.ac.ir
بهرام علیزاده: دانشیار زمین‌شناسی نفت، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، alizadeh@scu.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلفانفتول، هیدروکربن آروماتیک دوحلقه‌ای، جهش‌زای بالقوه و ترکیبی سمی برای موجودات است. حذف کامل آلاینده‌ها و تولیدنشدن آلاینده‌های ثانویه، سهولت در اجرا و بی‌نیازی از ابزارها و مواد شیمیایی گران‌قیمت از دلایل اهمیت روش‌های اصلاح زیستی نسبت به فناوری‌های فیزیکوشیمیایی برای پاکسازی منطقه آلوده هستند.

مواد و روش‌ها: ابتدا محیط پایه نمکی (BSM) تهیه و آلفانفتول، منبع کربن برای رشد باکتری‌ها، با غلظت ۱۰۰ppm به آن اضافه شد. سپس، نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده از منطقه آلوده به نفت که منبع باکتری بودند به محیط اضافه و محیط‌ها ۶ هفته در انکوباتور گرماگذاری شدند. باکتری‌ها با محیط پایه نمکی آگاردار دولایه با غلظت ۲۰۰ppm آلفانفتول جداسازی شدند و در مرحله بعد، کارایی جدایه‌ها در حذف آلفانفتول و دیگر هیدروکربن‌های آروماتیک با HPLC بررسی و جدایه برتر شناسایی شد.

نتایج: دو جدایه N1 و N2 با توانایی مصرف آلفانفتول جداسازی و خالص شدند. با آزمون‌های بیوشیمیایی و بر اساس توالی ژن *16S rRNA*، جدایه N1 نسبت به جدایه N2 با حذف ۸۰/۵ درصد آلفانفتول و کارایی بیشتر در حذف دیگر هیدروکربن‌های آروماتیک، جدایه برتر شناسایی شد و به گونه *سودوموناس پوتیدا* UW4 تعلق داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: جدایه N1 در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷ و طی ۱۵روز گرماگذاری، ۸۰/۵ درصد آلفانفتول با غلظت ۱۰۰ppmرا حذف کرد که مقدار درخور توجهی است. با توجه به نتایج، جدایه N1 درشرایط یادشده بخش گسترده‌ای از آلفانفتول را از محیط BSM حذف می‌کند و در شرایط مشابه، ممکن است بخش چشمگیری از آلفانفتول را از منطقه آلوده حذف کند.

واژه‌های کلیدی: آلفانفتول، *سودوموناس پوتیدا*، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای، مسجد سلیمان

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ترکیبات نفتی از مهم‌ترین آلاینده‌های شیمیایی هستند که در چهار گروه آسفالتن‌ها، هتروسیکلیک‌ها، آلیفاتیک و آروماتیک تقسیم‌بندی می‌شوند؛ این ترکیبات از منابع طبیعی و مصنوعی وارد اکوسیستم‌های آبی و خاکی می‌شوند و محیط را آلوده می‌کنند (۱ و ۲). هیدروکربن‌های آروماتیک، گروه بزرگ و ناهمگنی از ترکیبات آلی غیرقطبی هستند که به‌شکل طبیعی یا بر اثر فعالیت‌های انسانی ازجمله سوختن ناقص ترکیبات آلی مانند زغال سنگ، نفت، گاز و چوب و نیز صنایع پتروشیمی و بر اثر فعالیت‌های پالایش نفت تولید می‌شوند و محیط را آلوده می‌کنند (۳ و ۴). میانگین نیمه‌عمر هیدروکربن‌های آروماتیک مختلف در خاک و رسوبات از ۲ تا ۱۴۰۰ روز است و تا ماه‌ها یا حتی سال‌ها در محیط پایدار می‌مانند. این ترکیبات به‌شدت چربی‌دوست هستند و تمایل دارند که به رسوبات غنی از ترکیبات آلی اتصال و در جانداران تجمع زیستی یابند (۵). مطالعه‌های اپیدمیولوژی، شواهد روشنی از آثار سرطان‌زایی هیدروکربن‌های آروماتیک در افراد نشان داده‌اند؛ افراد به روش‌های مختلف (استنشاق، بلع و تماس پوستی) در معرض این ترکیبات قرار می‌گیرند (۶) و انتشار، متابولیسم، ذخیره یا دفع این مواد پس از تماس با فرد اتفاق می‌افتد و ممکن است بر سیستم تنفسی، تناسلی و عصبی فرد تأثیر گذارند و سقط جنین و سرطان را موجب شوند (۷). آلفانفتول یا ۱-هیدروکسی‌نفتالن، هیدروکربنی آروماتیک با دوحلقه بنزنی و محصول اصلی هیدروکسیلاسیون نفتالن در صنایع شیمی و نفت است که در محیط‌زیست از هیدرولیز شیمیایی یا زیست‌شناختی حشره‌کش کاربارِیل تولید می‌شود و جهش‌زای بالقوه و سمی برای موجودات اکوسیستم‌های مختلف است (۸). یکی از روش‌های حذف هیدروکربن‌های آروماتیک از مناطق آلوده، تلقیح منطقه با ریزموجودات تجزیه‌کننده این ترکیبات است (۹). اگرچه ممکن است هیدروکربن‌های آروماتیک پس از رهاشدن در محیط‌زیست تحت‌تأثیر اکسیداسیون شیمیایی، فتولیز و تبخیر قرار گیرند و جذب ذرات خاک شوند، تجزیه میکروبی مسیر اصلی تجزیه این هیدروکربن‌ها است(۱۰). ریزموجودات از هیدروکربن‌های آروماتیک برای منبع کربن و انرژی استفاده و محصولاتی نظیر آب و دی‌اکسیدکربن تولید می‌کنند (۱۱). استفاده از فناوری اصلاح زیستی برای پاکسازی منطقه آلوده روشی آسان، باصرفه و مؤثرتر از فناوری‌های فیزیکوشیمیایی است (۹).

امروزه با فناوری اصلاح زیستی، ریزموجودات مختلفی برای حذف هیدروکربن‌های آروماتیک از مناطق آلوده جداسازی شده‌اند. بیشتر این ریزموجودات به جنس‌های *سودوموناس*، *آلکالیجنز*، *مایکوباکتریوم*، *رودوکوکوس*، *استنوتروفوموناس*، *اسفینگوموناس*، *میکروکوکوس*، *فلاووباکتریوم* و برخی قارچ‌ها تعلق دارند (۹). بهبود بانک میکروبی (مجموعه ریزموجوداتی که ترکیبات سمی مختلف را تجزیه می‌کنند) در دسترس از منابع میکروبی و اطلاعات برای مدیریت مناسب مناطق آلوده ضروری است (۱۲). آلفانفتول، ترکیبی سمی و جهش‌زاست که حذف آن از محیط ضروری است. از آنجا که باکتری‌های بومی با شرایط محیطی ناحیه سازگار شده‌اند و بهتر از باکتری‌های غیربومی در ناحیه مدنظر رشد می‌کنند، باید از باکتری‌های بومی هر ناحیه برای حذف آلاینده از آن محیط استفاده شود. بنابراین هدف مطالعه حاضر، جداسازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده آلفانفتول از

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های خاک آلوده به نفت مسجد سلیمان و بررسی ویژگی‌ها و ارزیابی توانایی آنها برای تجزیه آلفانفتول و استفاده از آنها در ناحیه آلوده مدنظر است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک: نمونه‌برداری ازخاک‌های آلوده به نفت منطقه ۹ بهره‌برداری نفت و گاز مسجد سلیمان به آدرس جغرافیایی 31°56'11.00"N و 49°18'14.00"E انجام و از ۱۲ نقطه مختلف این منطقه نمونه‌برداری شد؛ به این شکل که ۳ نمونه خاک ۱۰۰ گرمی از عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری هر نقطه به مساحت ۱ مترمربع تهیه و با هم مخلوط شدند و مخلوط نمونه‌ها به‌عنوان نمونه واحد برای مطالعه استفاده شد (۱۳).

غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده آلفانفتول: برای غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده آلفانفتول و سازش با این ترکیب، از محیط پایه نمکی[1] شامل ۰/۸ گرم KH_2PO_4، ۱/۲ گرم K_2HPO_4، ۱ گرم NH_4NO_3، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۵۰ میلی‌گرم $FeCl_3$، ۲۰ میلی‌گرم $CaCl_2$، ۱ میلی‌گرم $MnSO_4$ و ۰/۲ میلی‌گرم Na_2MoO_4 در حجم کل یک لیتر استفاده شد. آلفانفتول با خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک آلمان تهیه و به‌عنوان تنها منبع کربن در محیط پایه نمکی برای غنی‌سازی استفاده شد؛ از غلظت ۱۰۰ppm آلفانفتول محلول در استون (۵ درصد) در ارلن‌های خالی استریل ریخته و پس از تبخیر حلال، ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی به هر ارلن اضافه شد. سپس، از ۵ گرم نمونه خاک به‌عنوان ماده تلقیحی در محیط پایه نمکی استفاده شد. این مجموعه به مدت ۲ هفته در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و تاریکی برای جلوگیری از اکسیداسیون نوری آلفانفتول گرماگذاری و در پایان هفته دوم، همان میزان آلفانفتول به محیط پایه نمکی تازه برای تکمیل‌شدن تجزیه افزوده شد. از ۱۰ درصد کشت غنی‌شده پیشین به‌عنوان ماده تلقیح استفاده و در شرایط یادشده گرماگذاری شد. در تمام مراحل، سه تکرار به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و مرحله غنی‌سازی سه بار پیش از جداسازی انجام شد (۹، ۱۴ و ۱۵). برای جداسازی باکتری‌ها، از محیط پایه نمکی-آگار دولایه‌ای با غلظت ۲۰۰ppm آلفانفتول در لایه رویی به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. در پایان غنی‌سازی، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه‌شده روی پلیت‌های محیط پایه نمکی-آگار دولایه‌ای پخش و ۲ هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۱۴).

روش تهیه محیط پایه نمکی-آگار دولایه‌ای: لایه رویی از مخلوط‌کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلفانفتول در استون (۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۴ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی آگاردار (۱ درصد) تهیه و پس از مخلوط‌شدن، محتویات بسیار سریع به لایه زیرین پلیت محیط پایه نمکی آگاردار ۱/۵ درصد اضافه شدند (۱۴).

شناسایی جدایه‌ها: ابتدا، جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی همچون رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، اوره‌آز، احیای نیترات، سیترات، تولید اندول، بررسی حرکت، آزمون O-F، رشد روی محیط مکانکی آگار، ستریمید آگار و تولید سولفیدهیدروژن شناسایی شدند. برای شناسایی دقیق‌تر از روش‌های مولکولی بر مبنای توالی ژن *16S rRNA* استفاده و با کیت استخراج ژنوم شرکت سیناژن، ژنوم جدایه مدنظر استخراج شد. سپس ژن *16S rRNA* با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از پرایمرهای عمومی در واکنش PCR تکثیر و محصول واکنش برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد. نتایج با نرم‌افزار بیوادیت مرتب و با برنامه BLAST در پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات فناوری بررسی شدند. درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار مگا۴ رسم شد.

برنامه دمایی واکنش PCR: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ادامه با ۳۰ چرخه از دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه و در نهایت سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه. توالی پرایمرهای استفاده‌شده مطابق جدول ۱ است (۱۶).

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده‌شده در واکنش PCR

پرایمر رفت	۳۷ باز	5´-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´	FD1
پرایمر برگشت	۳۷ باز	5´-CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT-3´	Rp1

میزان توانایی جدایه‌ها در حذف آلفانفتول: آلفانفتول، تنها منبع کربن با غلظت ۱۰۰ppm به‌شکل محلول در استون در ارلن‌های خالی استریل ریخته شد. پس از تبخیرشدن استون و ضمن هم‌زدن آرام، ۲۵ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی به هر ارلن افزوده شد. از جدایه‌ها در محیط پایه نمکی، سوسپانسیونی با جذب نوری ۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و ۲/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به‌عنوان منبع باکتری استفاده شد. کشت‌ها، ۱۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۵۰rpm و تاریکی گرماگذاری شدند. مقادیر معینی از هر نمونه در فاصله‌های ۷۲ ساعته برای استخراج آلفانفتول و آنالیز HPLC برداشته شد و ارلن‌های تلقیح‌نشده، شاهد در نظر گرفته شدند و سه تکرار برای هر جدایه در نظر گرفته شد (۹ و ۱۴).

میزان توانایی جدایه‌ها در تجزیه سایر هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای: تجزیه هر یک از هیدروکربن‌های آروماتیک نظیر فلوئورن[۲]، آنتراسن[۳]، کریزن[۴] و آسنفتن[۵] با غلظت ۱۰۰ppm در محیط پایه نمکی به‌عنوان تنها منبع کربن توسط جدایه‌ها طی ۱۵ روز گرماگذاری بررسی شد.

استخراج آلفانفتول از محیط‌کشت جدایه‌ها برای آنالیز کروماتوگرافی: در فواصل زمانی ۷۲ ساعته، ۲ میلی‌لیتر از هر نمونه برداشته و با ۵ میلی‌لیتر حلال هگزان برای استخراج ترکیب و مخلوط ۳ دقیقه ورتکس شد. پس از جداشدن فازها از یکدیگر، فاز آلی برداشته و به ویال تمیزی منتقل شد. پس از تبخیر حلال، عصاره باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر فاز متحرک HPLC حل و با فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری از نوع PTFE (مقاوم به حلال) فیلتر و در ویال‌های آماده برای آنالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

آنالیز نمونه‌ها: ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه برای آنالیز به HPLC تزریق و پیش از آن، دستگاه با نمونه‌های استاندارد کالیبره شد. فاز متحرک HPLC شامل ۸۰:۲۰ (v/v) استونیتریل: آب با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. حضور ترکیبات و متابولیت‌های مربوط به آنها در طول موج ۲۵۴ نانومتر تعیین و در مقایسه با نمونه‌های استاندارد مربوطه شناسایی شد (۱۸). میزان تجزیه ترکیب مدنظر برحسب درصد

Archive of SID

www.SID.ir

مطابق رابطه زیر محاسبه شد:

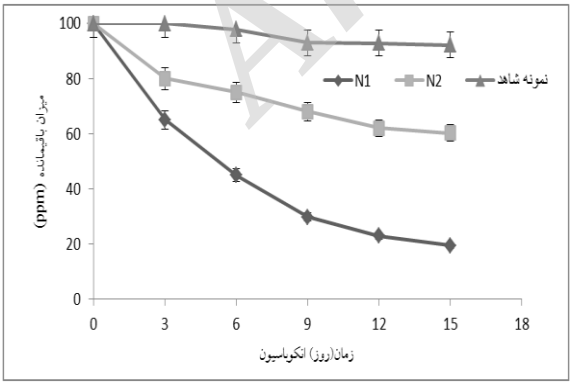
$$D(\%)=\frac{R_1-R_2}{T}\times 100$$

R_1= میزان ترکیب باقیمانده در نمونه شاهد، R_2= میزان ترکیب باقیمانده در نمونه مجهول، T= غلظت اولیه ترکیب مدنظر، D= درصد تجزیه ترکیب (۴ و ۱۸)

رسم منحنی رشد جدایه‌ها در حضور آلفانفتول: منحنی رشد جدایه‌ها با روش رقت‌سازی متوالی رسم شد. از غلظت ۱۰۰ppm آلفانفتول، تنها منبع کربن در محیط پایه نمکی استفاده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده برای هر جدایه در بافر فسفات استریل (۱۵۰mM، pH=۷) با کدورت ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌عنوان منبع باکتری در محیط کشت استفاده شد. در نهایت، کشت‌ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس، با روش رقت‌سازی (سه تکرار برای هر رقت)، رقت‌های 10^{-7}، 10^{-8} و 10^{-9} در ساعت صفر و زمان‌های بعدی تهیه و جدایه‌ها روی نوترینت‌آگار کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. تعداد سلول‌ها هر ۲۴ ساعت یک‌بار به مدت ۲۴۰ ساعت شمارش و منحنی رشد رسم شد (۱۹ و ۲۰).

نتایج

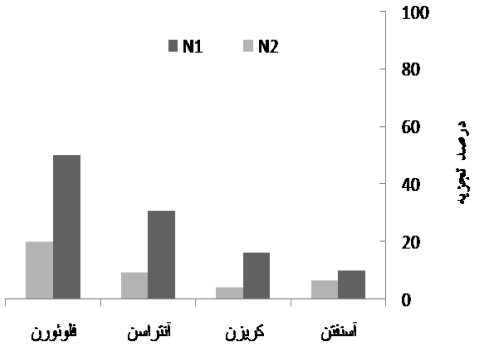
پس از افزودن نمونه‌های خاک به محیط پایه نمکی حاوی غلظت ۱۰۰ppm آلفانفتول که تنها منبع کربن و انرژی بود و سپس تلقیح روی محیط پایه نمکی-آگار، ۲ جدایه باکتریایی (N1 و N2) تجزیه‌کننده آلفانفتول جداسازی شدند. نتایج حاصل از HPLC نشان دادند که جدایه‌های N1 و N2، میزان آلفانفتول با غلظت ۱۰۰ppm در ساعت صفر را به‌ترتیب به ۱۹/۵ppm و ۶۰/۳ppm در روز پانزدهم کاهش داده‌اند که به‌ترتیب معادل ۸۰/۵ و ۳۷/۹ درصد تجزیه آلفانفتول طی ۱۵ روز گرماگذاری است. شکل ۱، میزان تجزیه آلفانفتول در فواصل زمانی سه روزه طی ۱۵ روز گرماگذاری را نشان می‌دهد؛ با گذشت زمان، میزان آلفانفتول در محیط‌کشت جدایه‌ها در حال کاهش است و بیشترین میزان کاهش در سه روز اول گرماگذاری انجام می‌شود. ثابت‌بودن تقریبی میزان آلفانفتول در محیط شاهد بدون باکتری، نشان می‌دهد که جدایه‌ها در نمونه‌های دارای باکتری، آلفانفتول را مصرف می‌کنند. نتایج آنالیز کروماتوگرافی نمونه‌های سایر هیدروکربن‌های آروماتیک نشان دادند که جدایه‌های N1 و N2 به‌ترتیب ۵۰/۱ و ۱۹/۹ درصد فلوئورن، ۳۰/۷ و ۹/۳ درصد آنتراسن، ۱۵/۹ و ۴ درصد کریزن و ۱۰ و ۶/۴ درصد آسنفتن را طی ۱۵ روز گرماگذاری تجزیه کرده‌اند (شکل ۲). منحنی رشد جدایه‌های یادشده با روش رقت‌سازی متوالی رسم شد و با توجه به این منحنی، جدایه N1 رشد بیشتری در حضور آلفانفتول، تنها منبع کربن، داشت. جدایه N1 در ساعت ۱۴۴ و جدایه N2 در ساعت ۱۲۰ به بیشترین رشد خود رسیده‌اند و سپس، رشد این جدایه‌ها به تدریج تا ساعت ۲۴۰ کاهش یافته است (شکل ۳).



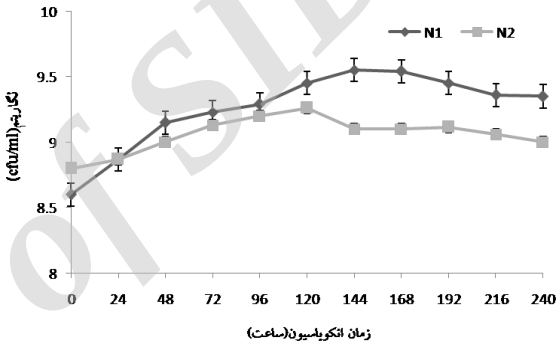
شکل ۱- منحنی میزان آلفانفتول باقیمانده در محیط‌کشت جدایه‌های N1، N2 و نمونه شاهد با غلظت اولیه ۱۰۰ppm آلفانفتول در فواصل سه روزه طی ۱۵ روز گرماگذاری

Archive of SID

www.SID.ir

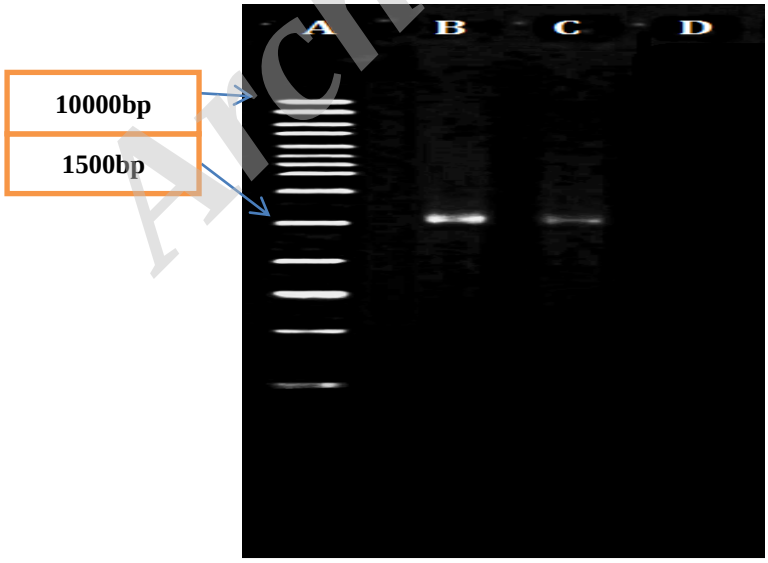


شکل ۲- میزان تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک مختلف توسط جدایه‌های N1 و N2 طی ۱۵ روز گرماگذاری



شکل ۳- منحنی رشد جدایه‌های N1 و N2 در محیط پایه نمکی با غلظت ۱۰۰ppm آلفانفتول، تنها منبع کربن، طی ۲۴۰ ساعت گرماگذاری

با توجه به اینکه جدایه N1 بیشترین میزان آلفانفتول را تجزیه کرد، جدایه برتر برای شناسایی انتخاب شد. بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشخص شد که این جدایه، باکتری میله‌ای گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت است که به جنس *سودوموناس* تعلق دارد (جدول۲). برای شناسایی دقیق‌تر از شناسایی مولکولی بر اساس تکثیر ژن *16S rRNA* در واکنش PCR استفاده شد. محصول PCR برای اطمینان از تکثیر ژن *16S rRNA* روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز (شکل ۴) و برای تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد. نتایج تعیین توالی با برنامه بلاست بررسی و جدایه مدنظر شناسایی شد؛ بر اساس این، جدایه N1 با ۹۹ درصد تشابه به گونه *سودوموناس پوتیدا* UW4 تعلق داشت. درخت فیلوژنتیکی این سویه با نرم‌افزار مگا۴ رسم شد (شکل ۵).



شکل ۴- الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن *16S rRNA* جدایه N1؛ A. لدر 1kb، B. نمونه شاهد مثبت، C. جدایه N1، D. نمونه شاهد منفی (آب مقطر)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه N1

آزمون / جدایه	رنگ گرم	رنگ کلونی	مورفولوژی	اکسیداز	کاتالاز	تشکیل اسپور	حرکت	نیترات	سیترات	آزمون O-F	مکانکی آگار	ستریمیک	اوره‌آز	تولید H_2S	تولید اندول
N1	منفی	سفید	باسیل	مثبت	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	O	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی

شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی (*Neighbor-joining*) جدایه N1 بر اساس توالی *16S rRNA*

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

غنی‌سازی انتخابی، روند یافتن موجودات سازش‌یافته با آلاینده‌های هیدروکربنی است؛ استفاده از چنین روش‌هایی موجب افزایش نسبت ریزموجودات مصرف‌کننده هیدروکربن در جامعه‌ای هتروتروف و تقویت رشد آنها خواهد شد (۲۱ و ۲۲). برای جداسازی باکتری‌ها، از محیط پایه نمکی-آگار دولایه‌ای استفاده شد و ترکیب آروماتیک در لایه رویی قرار گرفت که لایه‌ای نازک و دارای آگار کمتر بود و جدایه مدنظر به‌آسانی در آن رشد می‌کرد. افزایش غلظت منبع کربنی تا ۲۰۰ppm، حذف جدایه‌هایی را ممکن می‌کند که تحمل غلظت زیادی از ترکیب هدف را ندارند. میزان آگار بیشتر در لایه زیرین موجب حرکت جدایه‌های بی‌هوازی به این لایه می‌شود و از این رو، جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی را غیرممکن می‌کند. زنگ[۶] و همکاران از این محیط دولایه برای غربالگری جدایه‌های تجزیه‌کننده پیرن استفاده کردند (۱۴). در پژوهش حاضر، دو جدایه N1 و N2 جداسازی شدند که به‌ترتیب ۸۰/۵ و ۳۹/۷ درصد آلفانفتول را طی ۱۵ روز گرماگذاری تجزیه می‌کردند. در زمینه حذف زیستی آلفانفتول، مطالعه‌های کمی انجام شده است:

مولینا[۷] و همکاران سویه‌ای متعلق به *سودوموناس پوتیدا* را جداسازی کردند که قادر به تجزیه ۱۰۰ درصد آلفانفتول پس از ۱۲ روز گرماگذاری بود (۲۳). حضور مواد مغذی مختلف، حضور سویه‌های متفاوت تجزیه‌کننده و پارامترهایی مانند آنها بر میزان تجزیه زیستی ترکیبات آروماتیک تأثیر می‌گذارد. تجزیه‌پذیری زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای به پیچیدگی ساختار شیمیایی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها بستگی دارد (۱۵)؛ انحلال‌پذیری در آب و تبخیرپذیری این هیدروکربن‌ها با افزایش تعداد حلقه‌های بنزنی آنها به دلیل افزایش هیدروفوبیسیتی کاهش می‌یابد و به تجزیه میکروبی مقاوم‌تر می‌شوند(۲۴). در پژوهش حاضر، کریزن با چهار حلقه، آنتراسن، فلوئورن و آسنفتن با سه حلقه آروماتیک در مقایسه با آلفانفتول با دو حلقه آروماتیک به تجزیه زیستی مقاوم‌تر بودند و کریزن با بیشترین تعداد حلقه بنزنی، کمترین میزان تجزیه زیستی را داشت. شفیعی[۸] و همکاران طی پژوهشی، ۶ جدایه تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک را معرفی کردند که به فرم کنسرسیوم قادر به تجزیه ۱۰۰ درصد فنانترن، ۸۰ درصد آنتراسن، ۶۰ درصد پیرن، ۳۰ درصد فلوئورن و ۲۰ درصد فلورانتین طی ۱۰ روز گرماگذاری بودند؛ در پژوهش حاضر، فلورانتین با بیشترین تعداد حلقه آروماتیک کمترین میزان تجزیه زیستی را داشت (۱۵). رشد تصاعدی جدایه‌ها در نتیجه بیشترین غلظت ترکیب هدف در محیط‌کشت رخ می‌دهد و هنگامی که میزان رشد به حدی برسد که میزان ترکیب موجود در محیط آبی تأمین‌کننده رشد جدایه‌ها نباشد، رشد تصاعدی متوقف و باکتری وارد فاز سکون می‌شود. در پژوهشی که یعقوب‌زاده[۹] در زمینه حذف زیستی نفتالن انجام داد، بیشترین تعداد کلونی جدایه جداشده در ساعت ۱۴۴ گزارش شد و پس از آن رشد جدایه کاهش یافت و وارد فاز سکون شد؛ این، با روند رشد جدایه N1 در پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۵). جدایه N1، سویه باکتریایی کارا در پژوهش حاضر شناسایی شد و به گونه *سودوموناس پوتیدا* تعلق دارد. باکتری‌ها، فعال‌ترین عوامل در تجزیه نفت و نخستین تجزیه‌کنندگان آلودگی نفتی در محیط‌زیست هستند؛ چندین باکتری شناخته شده‌اند که منحصر از هیدروکربن‌ها تغذیه می‌کنند (۲۶-

Archive of SID

www.SID.ir

۲۸). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های *سودوموناس* به دلیل تولید آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده و بیوسورفکتانت‌ها برتری ویژه‌ای نسبت به باکتری‌های دیگر در استفاده از هیدروکربن‌ها به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی دارند (۲۹). سورفاکتانت‌ها باعث افزایش انحلال‌پذیری ترکیبات هیدروفوب در آب می‌شوند و ویژگی عمومی آنها، متراکم‌شدن در حدفاصل بین سطوح، کاهش کشش سطحی و تشکیل میسل است (۳۰). گونه‌های مختلفی از *سودوموناس‌ها* نظیر *سودوموناس آئروجینوزا*، *سودوموناس پوتیدا*، *سودوموناس مندوسیدا*، *سودوموناس فلورسانس*، *سودوموناس سپاسیا* تجزیه‌کنندگان هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای هستند و به‌فراوانی از خاک‌های آلوده به نفت جداسازی شده‌اند.

روش‌های زیستی برای حذف آلاینده‌های هیدروکروبنی نفت از مناطق آلوده به دلیل تولیدنکردن آلاینده‌های ثانویه، هزینه کمتر و کارایی بیشتر نسبت به روش‌های فیزیکوشیمیایی در کانون توجه هستند. آنچه فرایند اصلاح زیستی را به فرایندی بسیار مهم در عرصه حفاظت محیط‌زیست تبدیل می‌کند، استفاده از ریزموجودات بومی برای منطقه آلوده است. جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی و کارای تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک با توجه به ماهیت سرطان‌زای این ترکیبات برای حذف آنها از منطقه آلوده ضروری است. جدایه جداشده در پژوهش حاضر، در زمان کوتاهی میزان زیادی از آلفانفتول را بدون افزودن سورفکتانت سنتزی و ماده اولیه کومتابولیک حذف کرد و شاید میزان تجزیه این ترکیب جهش‌زا با افزایش دوره گرماگذاری افزایش یابد و با کمترین هزینه و بیشترین کارایی از منطقه آلوده پاکسازی شود.

Reference

(1) Partovinia A., Naeempour F. Bioremediation oil hydrocarbons contaminated-soil in slushy phase and the survey of effective parameters. *Oil research* 2008; 18(58): 3-10.

(2) Martínkova L., Uhnakova B., Patek M., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* 2009; 35: 162-177.

(3) Lin C., Gan L., Chen Z. L. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). *Journal of Hazardous Materials* 2010; 182: 771-777.

(4) Santos E. C., Jacques R. J. S., Bento F. M., Peralba M. C. R., Selbach P. A., Sa, E. L. S., Camargo F. A. O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology* 2008; 99: 2644-2649.

(5) Kathi S., Khan A. B. Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. *Indian Journal of Science and Technology* 2011; 4(1): 56-63.

(6) Bayoumi R. A. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research* 2009; 5(2): 197-211.

(7) Wick A. F., Haus N. W., Sukkariyah B. F., Haering K. C., Daniels W. L. *Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review*. Virginia Polytechnic Institute and State University Department of Crop and Soil Environmental Sciences: 2011; 1-102.

(8) Borraccino R., Kharoune M., Giot R., Agathos S., Nyns E. J., Naveau H. P., Pauss A. Abiotic transformation of catechol and 1-naphthol in aqueous solution influence of environmental factors. *Water Research* 2001; 35(15): 3729-3737.

Archive of SID

www.SID.ir

(9) Zhang G. Y., Ling J. Y., Sun H. B., Luo J., Fan Y. Y., Cui Z. J. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons–degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 580-586.

(10) Hadibarata T., Tachibana S., Itoh K. Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 164: 911-917.

(11) Ye J. S., Yin H., Qiang J., Peng H., Qin H. M., Zhang N., He B. Y. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 185: 174-181.

(12) Ling J., Zhang G., Sun H., Fan Y., Ju J., Zhang C. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A. *Science of the Total Environment* 2011; 409: 1994-2000.

(13) Dias A. C., Andreote F. D., Rigonato J., Fiore M. F., Melo I. S., Araujo W. L. The bacterial diversity in Brazilian non-disturbed mangrove sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010; 98: 541-51.

(14) Zeng J., Liu X., Zhang J., Li X. Isolation of polycyclic hydrocarbons degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 183: 718-723.

(15) Shafiee P., Shojaosadati S. A., Charkhabi A. H. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils. *Journal Chemistry* 2006; 25(3): 73-78.

(16) Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991; 173(2): 697-703.

(17) Mohamed T. A., Ahmed D., Mekki L., Amer D. The cacy of an oxidation pond in mineralizing some industrial waste products with special reference to fluorene degradation: a case study. *Waste Management* 1999; 19: 535-540.

(18) Chupungars K., Rengsamran P., Thaniyavarn S. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2009; 63: 93-99.

(19) Toledo F. L., Calve C., Rodelas B. J. G. L. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* 2006; 29: 244-252.

(20) Tao X. Q, Lu G. N., Dang Z., Yi X. Y., Chen Y. Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and characterization of phenanthrene metabolites. *Journal of Microbiology and Biotechnolog* 2007; 23: 647-654.

(21) Vincent M. Microbial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oily sludge wastes. *Journal of Environmental Science and Technology* 2011; 1-13.

(22) Fingerman M., Nagabhushanam R. *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystem*. Department of Ecology and Evolutionary Biology. Tulane University New Orleans, Louisiana 70118: Science Publishers; 2005.

(23) Molina M. C., Gonzalez N., Bautista L. F., Sanz R., Simarro R., Sanchez I., et al. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation* 2009; 20: 789-800.

(24) Juhasz A. L., Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2000; 45: 57-88.

(25) Yaghoubzadeh Z. Isolation and evaluation their growth kinetic of positive gram bacteria degrader in southern region of

Archive of SID

www.SID.ir

the Caspian sea. *Environmental Sciences* 2008; 5(4): 115-122.

(26) Brooijmans R. J. W., Pastink M. I,. Siezen R. J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil spill clean-upcrew. *Microbial Biotechnology* 2009; 2(6): 587-594.

(27) Yakimov M. M., Timmis K. N., Golyshin P. N. Obligateoil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18(3): 257-266.

(28) Rahman K. S. M., Rahman T. J., Kourkoutasa Y., Petsas I., Marchant R., Banat M. I. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 2003; 90(2): 159-168.

(29) Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International* 2011; 1-13.

(30) Li J. L., Chen, B. H. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Review. *Materials* 2009; 2: 76-94.

[1]- Basal Salt Medium
[2]- Fluorene
[3]- Anthracene
[4]- Chrysene
[5]- Acenaphthene
[6]- Zeng
[7]- Molina
[8]- Shafiee
[9]- Yaghoubzadeh

Archive of SID

www.SID.ir