مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم، شماره اول (پیاپی ۱۴) بهار ۱۳۹۲
صفحات ۴۴-۳۴

Original Article

پتانسیل زیست درمانی باکتری‌های گرم مثبت بومی جداسازی شده از خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای

سمیه اسکندری*[۱]، مهران هودجی[۲]، آرزو طهمورث پور[۳]، آتوسا عبدالهی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه خاک شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه خاک شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه علوم پایه پزشکی، [۴] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه شیمی

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای پراکنش وسیعی در محیط زیست دارند و به عنوان یکی از عوامل سرطان زا و جهش زا در موجودات مطرح میباشند. از بین تمامی روش‌های حذف آلودگی، زیست پالایی به کمک فرآیندهای میکروبی با کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان قادر به تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیرسمی می باشند. این مطالعه با هدف بررسی امکان رشد باکتری‌های بومی جداسازی شده از خاک آلوده به نفت در حضور ترکیبات PAH در آزمایشگاه و نیز شناسایی آنها با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز انجام شده است.

مواد و روش ها: نمونه های مورد پژوهش از خاک های آلوده اطراف مخازن نفت و بنزین پالایشگاه شهر اصفهان جمع آوری گردید. در ابتدا با استفاده از محیط کشت پایه حاوی غلظت ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر از ۱۶ ترکیب PAH، باکتری‌های بومی از خاک آلوده به این ترکیبات جداسازی گردید. سپس باکتری‌هایی که قادر به رشد و تکثیر در حضور این ترکیبات بودند با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و روش تعیین توالی ژنوم شناسایی و به عنوان گونه های جدید ثبت گردیدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که تقریباً ۱۳/۳ درصد از کل باکتری‌های هتروتروف قدرت تجزیه کنندگی هیدروکربن‌ها را دارند. پس از ارزیابی آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی مشخص گردید که باکتری‌های بومی جداسازی شده به گونه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* ATHE9، *باسیلوس مجاونسیس* ATHE13 و گونه ای خاص از *باسیلوس* (ATHE10) تعلق دارند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه تأیید کننده اهمیت و کارایی باکتری های بومی در راستای پالایش آلودگی ترکیبات PAH از محیط‌های آلوده می باشد.

واژگان کلیدی: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای، خاک های آلوده، زیست پالایی، واکنش زنجیره ای پلی مراز.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۱

مقدمه

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons= PAHs) ترکیبات معطری هستند که دارای دو یا چند حلقه بنزنی می باشند. این ترکیبات در زمان تخریب دمایی مولکول‌های آلی و ترکیبات مشابه آنها تشکیل می شوند (۱ و ۲). مهمترین منابع این ترکیبات در محیط می توان به فعالیت‌های انسانی، آتش سوزی جنگل ها و مراتع، نشت نفت، آتشفشان ها و صنایع اشاره نمود (۳). برخی از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای شامل نفتالن، اسنفتیلن، اسنفتن و فلورن (هیدروکربن های ۲ حلقه ای)، فنانترن، آنتراسن و فلورانتن (هیدروکربن‌های ۳ حلقه

* آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه خاک شناسی
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۸۳۰۱۰ پست الکترونیک: Eskandary.s@gmail.com

ای)، بنزو a آنتراسن، کریسن، پیرن، بنزو b فلورانتن، بنزو k فلورانتن (هیدروکربن‌های ۴ حلقه ای)، بنزو a پیرن، دی بنزو ah آنتراسن، ایندنو پیرن (هیدروکربن‌های ۵ حلقه ای) و بنزو ghi پریلن (هیدروکربن های ۶ حلقه ای) می باشند. امروزه ترکیبات PAH به عنوان ترکیبات آلاینده سمی، جهش زا و سرطانزا شناخته شده اند (۴). احتمالاً این ترکیبات اولین و مهمترین ترکیبات سرطان زای محیطی نیز محسوب می گردند که در شرایط طبیعی به راحتی از محیط حذف نمی‌شوند. با افزایش وزن مولکولی ترکیبات آروماتیک مقاومت شان در برابر تجزیه نیز بیشتر می‌شود. این ترکیبات به دلیل حضور مداوم در انواع اکوسیستم‌ها، هوا، خاک و رسوبات، مقاومت در برابر زیست پالایی و پتانسیل تجمع زیستی توجه بیشتر محققین محیط زیست را به خود جلب نموده است. هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای ممکن است به کمک تبخیر، اکسیداسیون نوری، اکسیداسیون شیمیایی، جذب سطحی ذرات خاک و آبشویی از محیط پالایش گردند (۵). با این وجود این روش ها معمولاً گران قیمت هستند و موجب انتقال آلودگی از یک فاز به فاز دیگر می شوند. مطالعات نشان داده است که از بین تمامی روش‌های حذف آلودگی، زیست پالایی فرآیندی است که کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان را لازم دارد و موجب تغییر شکل آلاینده از فرم خطرناک به فرم کم خطر یا بی‌خطر می گردد (۶ و ۷).

اگرچه عوامل محیطی مانند اسیدیته، رطوبت، اکسیژن و عناصر غذایی در دسترس می‌توانند تجزیه ترکیبات PAH را به وسیله میکروارگانیسم ها تحت تأثیر قرار دهند، اما آنچه مشخص است این است که فرآیندهای میکروبی سهم بیشتری در تجزیه این ترکیبات به عهده دارند (۸ و ۹). میکروارگانیسم ها از ترکیبات PAH به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نموده و موجب تجزیه و کاهش سمیت شان می گردند. سرعت و میزان تجزیه، به تعداد حلقه‌های PAH وابسته است. به طوری که ترکیبات دارای تعداد حلقه‌های زیاد و وزن مولکولی زیاد، مقاومت بیشتری نسبت به تجزیه دارند (۱۰).

امروزه، باکتری‌هایی زیادی که توانایی استفاده از انواع PAH را دارند جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفته اند. تجزیه PAH به وسیله باکتری ها معمولاً از طریق اکسیداسیون اولیه این ترکیبات به کاتکول (Catechol) آغاز می‌شود. باکتری‌ها معمولاً دو مولکول اکسیژن را به یک حلقه بنزنی متصل کرده و از طریق آنزیم دی اکسیژناز، سیس دی هیدرودیول و در نهایت کاتکول را ایجاد می نمایند. درزمان هیدروکسیله شدن اولین حلقه آروماتیک، دومین حلقه نیز مورد حمله قرار می گیرد و به همان شکل تجزیه می شود. در محیط های آلوده، میکروارگانیسم‌های موجود در جمعیت‌هایی با پیچیدگی و تنوع زیاد وجود دارند. عوامل پیچیده‌ای در درک رفتار باکتری در مورد متابولیسم ترکیبات PAH در محیط مؤثر هستند. به همین دلیل معمولاً کمتر از یک درصد از میکروارگانیسم ها توانایی رشد در محیط های آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را دارند (۱۰).

آیتکن (Aitken) و همکاران در سال ۱۹۹۸ از مکان‌های آلوده به نفت وگازوئیل، ۱۱ جنس از باکتری های تجزیه کننده برخی از ترکیبات PAH را جداسازی نمودند. مهمترین باکتری های جدا شده از پژوهش یاد شده *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *آگروباکتریوم* (*Agrobacterium*)، *باسیلوس* (*Bacillus*) و *اسفنگوموناس* (*Sphingomonas*) بودند (۱۱). آندرونی (Andreoni) و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ایتالیا با استفاده از پرایمر عمومی 16S rDNA باکتری‌های تجزیه کننده فنانترن را از خاک های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای را شناسایی نمودند. نتایج آن ها نشان داد که بیشتر این باکتری ها از جنس های *زانتوموناس* (*Xanthomonas*)، *متیلوباکتریوم* (*Methylobacterium*)، *آکروموباکتر* (*Achromobacter*) و آکوامیکروبیوم (*Aquamicrobium*) بوده اند (۱۲). ما (Ma) و همکاران در سال ۲۰۱۲ موفق به جداسازی گونه ای از باکتری *سودوموناس* شدند که توانایی تجزیه و حذف ترکیبات فلورن و فنانترن را در دامنه دمایی ۴ تا ۳۷ درجه سانتی گراد داشت. یافته های آن ها نشان داد که این سویه کارایی بالایی در حذف ترکیبات فلورن و فنانترن از خاک مناطق سردسیر و یا فصول سرد سال دارد (۱۳). همچنین در

سال ۲۰۱۳ مایتی (Maiti) و همکاران گونه ای از *باسیلوس* را از خاک پالایشگاهی در هندوستان جداسازی و شناسایی نمودند. این سویه توانایی معدنی کردن آنتراسن، فلورانتن، پیرن و بنزو a پیرن و نیز ویژگی تولید بیوسورفکتانت را داشت (۱۴).

هدف از این پژوهش، بررسی امکان رشد باکتری های بومی جداسازی شده از خاک آلوده به نفت در حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در آزمایشگاه و نیز شناسایی آن ها با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction (PCR) و ثبت آن ها به عنوان گونه‌های جدید بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: در این مطالعه از خاک های آلوده اطراف مخازن نفت و بنزین پالایشگاه شهر اصفهان استفاده گردید. نمونه ها پس از جمع آوری به گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان انتقال داده شدند.

ب) اندازه گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک: پس از تهیه عصاره اشباع، اسیدیته خاک به وسیله دستگاه pH متر مدل ۲۶۲ کالیبره شده با محلول های بافر، اندازه گیری شد. هدایت الکتریکی عصاره اشباع توسط دستگاه هدایت‌سنج مترـ اهم، تعیین گردید (۱۵).

ج) اندازه گیری غلظت ترکیبات PAH در نمونه خاک: ابتدا ۱۰ گرم نمونه خاک عبور داده شده از الک ۲ میلی متری با ۱۰ گرم Na2SO4 مخلوط و به وسیله ۱۵۰ میلی لیتر استون و دی کلرو متان (۱:۱) عصاره گیری گردید. پس از روتاری و کاهش حجم، نمونه ها با ۱ میلی لیتر نرمال هگزان به دستگاه GC-FID مدل اجیلنت A۷۸۹۰ تزریق گردیدند (۱۶). دمای ورودی این دستگاه ۲۶۰ درجه سانتی گراد، دمای دتکتور ۲۷۰ درجه سانتی گراد، جریان گاز حامل ازت ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه، افزایش دما از ۷۰ درجه سانتی گراد شروع و با شیب ۵ درجه سانتی گراد در دقیقه به ۲۹۰ درجه سانتی گراد رسانیده شد.

د) شمارش جمعیت باکتری‌های هتروتروف در خاک آلوده: به منظور بررسی حضور باکتری های هتروتروف در خاک آلوده اقدام به کشت رقت‌هایی از نمونه یک گرمی خاک در محیط کشت نوترینت آگار شد. پس از ۳ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد شمارش کلنی‌ها انجام شد (۱۷).

ه) غنی سازی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH: برای این منظور ابتدا در یک لوله آزمایش، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه نمکی (شامل ۵۳۵۰ میلی گرم Na_2HPO_4، ۲۶۷۰ میلی گرم NH_4Cl، ۰/۶ میلی گرم $CaCl_2.H_2O$، ۶ میلی گرم $MgSO_4$، ۲/۴ میلی گرم $FeSO_4.H_2O$ و ۰/۰۹ میلی گرم $MnSO_4.H2O$ و ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای شامل: نفتالن، اسنفتن، اسنفتیلن، فلورن، فنانترن، آنتراسن، فلورانتن، پیرن، بنزو a آنتراسن، کریسن، بنزو b فلورانتن، بنزو k فلورانتن، بنزو a پیرن، بنزو ghi پریلن، دی بنزو ah آنتراسن و ایندنو در۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) با یک گرم خاک مخلوط گردید. ترکیب حاصل به مدت یک هفته بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ (rpm) و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد (۱۷). پس از گذشت یک هفته، یک میلی لیتر از این محیط کشت به محیط کشت های جدید پایه نمکی حاوی ترکیبات PAH تزریق گردید. این مرحله حداقل با سه تکرار، قبل از جداسازی باکتری‌ها انجام گرفت (۱۷).

و) شمارش باکتری‌های تجزیه کننده PAH: برای این منظور از لوله های حاوی محیط کشت و باکتری که کدورت در آنها مشاهده می شد رقت‌های مختلف به نسبت ۱:۱۰ تهیه گردید. سپس بر روی محیط کشت جامد حاوی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای کشت داده شد. پس از ۳ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، شمارش کلنی انجام شد. در نهایت درصد باکتری هایی که توانایی استفاده از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای محیط را داشتند با توجه به تعداد کل باکتری‌های هتروتروف محاسبه شد (۱۸).

ز) جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده PAH: برای این منظور از کلنی های تک تشکیل شده بر روی محیط کشت جامد پایه نمکی حاوی غلظت ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر از این ترکیبات

استفاده گردید. سپس کلنی های دارای شکل و مورفولوژی متفاوتی انتخاب و به لوله‌های حاوی محیط کشت مایع پایه نمکی منتقل شدند (۱۹).

ط) شناسایی جدایه های تجزیه هیدروکربن‌ها: پس از رنگ آمیزی گرم و مشاهده باکتری ها توسط میکروسکوپ نوری، سویه های برتر به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، کاتالاز، تخمیر لاکتوز، گلوکز، سوکروز و رشد در محیط بی هوازی شناسایی گردیدند (۲۰).

ح) واکنش زنجیره ای پلی مراز: پس از استخراج DNA باکتری به وسیله کیت DNP™ (CinnaGen)، حدود ۱۰۰۰ باز در محدوده ژن 16S rDNA به وسیله پرایمر عمومی با توالی F27 (5-AGCGGTCCAGAGTTTTCCTGG-3) و R1492 (5-CTCTCTGCAGCCCTTGTTACG-3) و روش PCR تکثیر گردیدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۸۴۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی، ۱۰۰ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۴۰ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲۰ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Smart–Taq DNA Polymerase انجام گردید. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد (۲۱).

ط) ارزیابی رشد باکتری ها در حضور ترکیبات PAH: یک میلی لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری های خالص سازی شده که کدورت آن برابر استاندارد نیم مک فارلند بود به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت جدید که غلظت ۱۲/۸ میلی گرم از ۱۶ هیدروکربن مورد بررسی تلقیح گردید. سپس در فواصل زمانی ۲۴ ساعته میزان رشد باکتری به وسیله کدورت سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۷).

ی) تجزیه و تحلیل داده ها: در این مطالعه برای رسم نمودار و محاسبه خطای استاندارد از نرم افزار آماری Excel استفاده گردید.

یافته ها

در جدول ۱ برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد بررسی در این مطالعه و نیز مقادیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مورد استفاده به منظور بررسی شرایط بهینه رشد باکتری‌ها نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که خاک مورد مطالعه از لحاظ اسیدیته و شوری فاقد هرگونه محدودیتی برای رشد و تکثیرمیکروارگانیسم ها می باشد. همچنین با شمارش باکتری‌های هتروتروف بر روی محیط کشت نوترینت آگار و محیط کشت پایه نمکی جامد حاوی ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر از PAH مشخص شد که تقریباً ۱۳/۳ درصد از کل باکتری های هتروتروف جداشده توانایی قدرت تجزیه کنندگی هیدروکربن‌ها را دارند.

از بین کلنی های جدایه‌های تجزیه کننده بر روی محیط کشت جامد حاوی PAH ، ۹ جدایه کلنی های متمایزی را داشتند. از این میان سه جدایه که در محیط کشت پایه در زمان ۲۴ ساعت بیشترین کدورت را داشتند، به عنوان جدایه های برتر انتخاب

جدول ۱: برخی از ویژگی های شیمیایی خاک آلوده.

خصوصیت	مقدار	خصوصیت	مقدار
اسیدیته	۷/۲۴	نفتالن (mg/kg)	۳۲±۵
هدایت الکتریکی (dS/m)	۳/۴	اسنفتن (mg/kg)	۳۷±۹
تعداد باکتری‌های هتروتروف (CFU/g)	۳ 10^6	اسنفتیلن (mg/kg)	۴۴±۵
تعداد باکتری‌های تجزیه کننده (CFU/g)	۴ 10^5	آنتراسن (mg/kg)	۷±۲
بنزو a آنتراسن (mg/kg)	۳۱±۴	فنانترن (mg/kg)	۱۰±۵
بنزو a پیرن (mg/kg)	۶±۲	کریسن (mg/kg)	۶۴±۱۱
بنزو ghi پریلن (mg/kg)	۷±۰/۵	دی بنزو ah آنتراسن (mg/kg)	۸±۴

شدند. نتایج به دست آمده از آزمون های بیوشیمیایی انجام شده بر روی این سه جدایه در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از ارزیابی آزمون های بیوشیمیایی مشخص گردید که باکتری های جداسازی شده به جنس *باسیلوس* تعلق داشتند. شناسایی این باکتری ها در حد گونه با استفاده از تعیین توالی ژنوم و شماره دسترسی آنها در سایت مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information) در جدول ۳ نشان داده شده است.

به منظور بررسی میزان رشد باکتری ها در حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای اقدام به رسم منحنی رشد باکتری شناسایی شده گردید (شکل ۱).

در این مطالعه به منظور غنی سازی باکتری های تجزیه کننده از غلظت های مختلف ترکیبات PAH (۶/۱ تا ۱۴/۴ میلی گرم بر لیتر) استفاده گردید. نتایج نشان داد که با اضافه شدن نمونه خاک به لوله های حاوی محیط کشت پایه با غلظت های کمتر از ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر، کدورت ناشی از رشد و تکثیر باکتری ها به سرعت در محیط کشت افزایش می یابد و قابل

جدول ۲: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برروی جدایه‌های انتخابی.

جدایه	۱	۸	۹
شکل	باسیل	باسیل	باسیل
واکنش گرم	+	+	+
تولید اسپور	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
اسید از گلوکز	–	+	+
سیترات	+	+	+
حرکت	+	+	+
تولید ایندول	-	+	-
اسید از لاکتوز	-	+	+
اسید از مانیتول	+	+	+
رشد در اسیدیته ۵/۶	+	+	+
رشد بی هوازی	+	-	+
رشد بر روی کلرید کلسیم ۵ ٪	+	+	+
رشد بر روی کلرید کلسیم ۷ ٪	+	+	+
رشد بر روی کلرید کلسیم ۱۰ ٪	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	–
حداکثر دمای رشد (°C)	۵۰	۵۰	۵۵
رشد در ۳۰ درجه سانتی گراد	+	+	+
اسید از ساکارز	+	+	+
تولید H_2S	-	+	-

مشاهده می گردد. اما در غلظت های بیشتر از ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر کدورت در لوله های آزمایش پس از چند روز ایجاد شد. به همین دلیل برای غنی سازی باکتری ها از غلظت ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر استفاده گردید. از آنجایی که هیچ منبع کربن دیگری به جز هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محیط کشت پایه وجود نداشت، از این رو می توان نتیجه گیری نمود که این جدایه‌ها تنها از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان منبع کربن استفاده نموده اند.

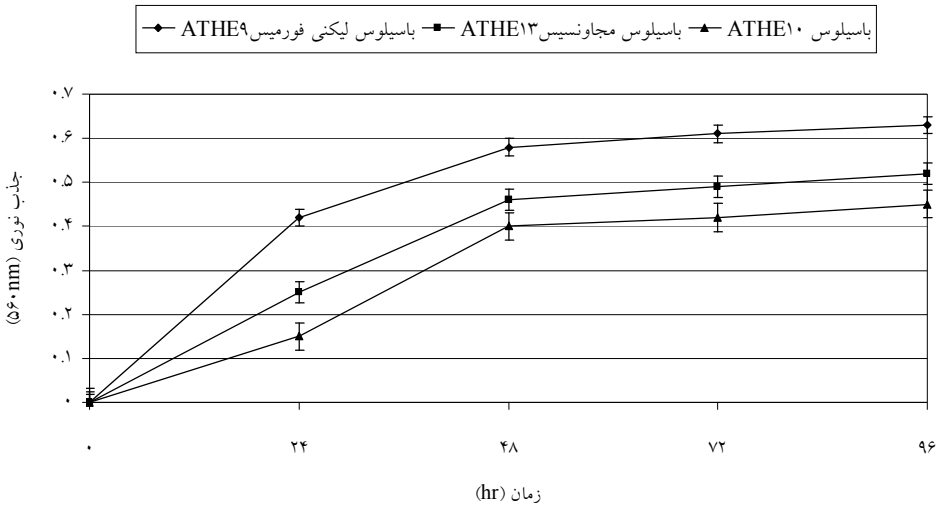
جدول ۳: شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش 16S rRNA.

جدایه	تعیین هویت مولکولی	شماره دسترسی
۱	*باسیلوس لیکنی فورمیس* ATHE9	KC329470.1
۸	*باسیلوس مجاونسیس* ATHE13	KC469987.1
۹	*باسیلوس* .ATHE10 sp	KC329471.1

بحث

از میان ترکیبات نفتی، ترکیبات آروماتیک به دلیل داشتن حلقه های بنزن پایداری بیشتری دارند و هر چه تعداد این حلقه ها بیشتر باشد، تجزیه میکروبی آنها نیز سخت تر خواهد بود (۲۲). در پژوهش حاضر از ۱۶ هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده گردید. غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای در خاک مورد بررسی در این مطالعه بسیار زیاد و حتی چندین برابر استانداردهای جهانی (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) برای وجود این ترکیبات در خاک گزارش گردید (۲۳). در مجموع نتایج ما نشان می دهد که حدود ۱۳/۳ درصد از باکتری‌های هتروتروف موجود در خاک آلوده، دارای قدرت تجزیه کنندگی این ترکیبات بوده اند.

امروزه بیش از ۷۹ جنس باکتریایی شناسایی شده است که قادر به استفاده از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان منابع کربن و انرژی می باشند. از مهم ترین این باکتری ها می توان به جنس های *آلکانیوواراکس* (*Alcanivorax*) و *سودوموناس* اشاره نمود. با این وجود مشخص است که این میکروارگانیسم ها تنها اجزای فرآیند زیست پالایی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای نمی باشند. بلکه بخشی از یک شبکه اکولوژیک هستند که به طور مستقیم و غیرمستقیم با سایر اجزای محیط در ارتباط می باشند. در واقع عواملی مانند رقابت برای مواد غذایی محدود کننده، شکار شدن توسط پروتوزوآ، لیز شدن به وسیله فاژها و برهم کنش های اشتراکی که موجب افزایش تجزیه زیستی می گردد بر فعالیت این میکروارگانیسم ها تأثیرگذار هستند (۴). در مطالعه حاضر سه سویه جداسازی شده شامل گونه های *باسیلوس لیکنی*



شکل ۱: منحنی رشد جدایه‌ها در حضور هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای.

فورمیس (*B. licheniformis*)، *باسیلوس مجاونسیس* (*B.mojavensis*) و گونه ای خاص از *باسیلوس* (*B. sp ATHE10*) بودند که توانایی رشد در غلظت ۱۲/۸ میلی گرم بر لیتر از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای را دارا بودند. نتایج مشابهی در سال ۲۰۰۶ توسط تولدو (Toledo) و همکاران گزارش گردید. این محققان موفق به جداسازی ۱۵ جدایه باکتریایی بر اساس توانایی رشد در حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای موجود در مناطق آلوده به نفت خام شدند. بیشتر این باکتری ها به گونه های *باسیلوس پومیلوس* (*B. pumilus*)، *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*)، *آلکالیژنز فیکالیس* (*A. ficalis*) و *انتروباکتر* (*Enterobacter*) تعلق داشتند. این باکتری ها توانایی حذف ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر از نفتالن، فنانترن، فلورانتن و پیرن را در مدت ۷۲ ساعت را داشتند (۲۴).

تنموژی (Thenmozhi) و همکاران در سال ۲۰۱۲ دو گونه باکتریایی را از خاک آلوده به نفت خام جداسازی نمودند. پس از بررسی به وسیله PCR این جدایه ها به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *باسیلوس لیکنی فورمیس* معرفی گردیدند. این سویه ها قادر به حذف ۵ میلی گرم بر لیتر آنتراسن، فنانترن و تولوئن در مدت زمان ۴۸ ساعت بودند (۲۵).

دین رز (Dean Ross) و همکاران دو جدایه باکتریایی *ردوکوکوس* (*Rhodococcus*) و *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*) را از رسوبات رودخانه جداسازی نمودند. هر دو این باکتری ها توانایی تجزیه ترکیبات PAH را داشتند (۲۶). هاریتاش (Haritash) و همکاران در سال ۲۰۰۹ پس از تلقیح سلول های *رودوتورولا گلوتینیس* (*Rhodotorula glutinis*) و *سودوموناس آئروژینوزا* به محیط کشت پایه معدنی مشاهده نمودند که تقریباً تمام فنانترن موجود در محیط در مدت زمان یک ماه توسط هر یک از دو سویه حذف شده است. همچنین مطالعه آن-ها نشان داد که تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک ارتباط مستقیمی با چگالی میکروبی و توده زیستی (بیومس) دارد به طوری که با افزایش توده زیستی تجزیه این ترکیبات نیز افزایش پیدا می‌نمود (۱۰).

در مطالعه ای که توسط امان (Eman) و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت باکتری های *کلبسیلا اوکسی توکا* (*Klebsiella oxytoca*)، *کلبسیلا نمونیه* (*Klebsiella pneumonia*) و گونه ای از *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter* sp.) از نمونه‌های خاک آلوده به نفت خام جداسازی شدند. این سویه ها قادر به حذف ترکیباتی چون فنانترن، فلورانتن، پیرن و بنزن بودند. از میان باکتری‌های جداسازی شده *کلبسیلا اوکسی توکا* بیشترین کارایی را در حذف ترکیبات سمی داشت (۲۷).

یوآن (Yuan) و همکاران در سال ۲۰۰۳ موفق به جداسازی شش گونه باکتری گرم منفی از زباله‌های پتروشیمی دفن شده گردیدند. این سویه ها توانایی تجزیه اسنفتیلن، فلورن، فتانترن، آنتراسن و پیرن را داشتند. از ۴ جدایه شناسایی شده ۲ جدایه به عنوان *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas flouresens*) و *هموفیلوس* (*Haemophilus*) معرفی شدند (۲۸). تبیانیان (Tebianian) و همکاران نیز برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۹۱ اقدام به شناسایی باکتری های تجزیه کننده ترکیبات آلیفاتیک جدا شده از پساب های نفتی در شهرهای کرمان و تهران نمودند. با استفاده از روش های غنی سازی در محیط بوشنل هاس حاوی هگزادکان (به عنوان منبع کربن) در مجموع ۱۵ سویه باکتریایی تجزیه کننده جداسازی گردید. به طوری که بیشتر این باکتری ها به جنس های *سودوموناس*، *رودوکوکوس* (*Rhodococcus*) و *استنوتروفوموناس* (*Stenotrophomonas*) تعلق داشتند (۲۹).

در پژوهش حاضر، انتخاب جدایه های برتر بر اساس روش کدورت سنجی صورت پذیرفت. در این مطالعه سه جدایه انتخاب شده در مجاورت مواد آلاینده از حداکثر کدورت نسبت به سایر جدایه ها در حداقل زمان برخوردار بودند. لیز (Leys) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ باکتری *اسفنگوبیوم* (*Sphingobium- yanoikuyae* B1) را به دلیل داشتن غلظت سلولی بیش از 10^4 واحد تشکیل کلنی در یک گرم خاک آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (CFU/g soil) به عنوان بهترین گونه جهت پالایش این ترکیبات از خاک معرفی

نمودند (۳۰). هدف از این مطالعه تنها جداسازی و شناسایی باکتری هایی با توانایی رشد و تکثیر در حضور ترکیبات PAH بود. از این رو به محیط کشت پایه در مرحله غنی سازی، جداسازی و خالص سازی منبع کربن دیگری به جز PAH اضافه نشد. بنابراین ایجاد کدورت در محیط کشت و افزایش جذب نوری (۵۶۰ نانومتر) با گذشت زمان، به عنوان معیار مصرف این ترکیبات توسط باکتری های انتخابی در نظر گرفته شد.

در پژوهش حاضر، منحنی رشد باکتری های برتر نشان داد که این باکتری ها بدون هیچ گونه فاز تأخیری در محیط کشت شروع به رشد کرده و با رسیدن به فاز نمایی حداکثر سرعت رشد را در مجاورت ماده آروماتیک را داشتند. با گذشت زمان و کاهش هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به عنوان منبع کربن، میزان رشد و تکثیر آنها کاسته شده و باکتری ها وارد فاز سکون شدند. پس از ورود به فاز مرگ نیز جذب نوری کاهش یافته و منحنی رشد باکتری روال نزولی را داشت.

مطالعه مشابهی توسط سینگر (Singer) و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شده است. این محققان باکتری *اسفنگوبیوم* را با هدف بررسی چگونگی رشد در حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای انتخاب نمودند. نتایج آنها نشان داد که *اسفنگوبیوم* می تواند به منظور رشد و تکثیر خود از دامنه وسیعی از ترکیبات آلاینده از جمله ترکیبات PAH به عنوان منبع کربن استفاده نماید (۳۰). نکته قابل توجه در مطالعه سینگر و همکاران این بود که در شرایط نبود ترکیبات PAH در خاک، *اسفنگوبیوم* در مدت زمان ۱۰ روز از بین می‌رفت. زیرا نبودن ترکیبات یاد شده به معنای وجود نداشتن منبع کربن مورد نیاز باکتری بود. اما نتایج پژوهش یاد شده نشان داد که در صورت افزودن ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم فنانترن و پیرن به خاک اضافه ، جمعیت این باکتری در مدت زمان ۳۰ روز به شدت بر سایر باکتری ها غلبه پیدا می کرد. آن-ها همچنین بیان نمودند که توانایی باکتری ها در تجزیه و زیست پالایی ترکیبات نه تنها به ویژگی کاتابولیک آنها وابسته است بلکه به توانایی آنها در حفظ بقای در خاک های آلوده نیز بستگی دارد (۳۱).

نتیجه گیری

با توجه به خطرات ناشی از حضور هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای در محیط برای حیات موجودات زنده به ویژه انسان ، حذف این ترکیبات از محیط بسیار حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه با جداسازی و شناسایی گونه های باکتریایی که توانایی رشد و تکثیر در محیط های آلوده به ترکیبات PAH مشخص گردید که حذف این ترکیبات از محل های آلوده می تواند با استفاده از باکتری های بومی جداسازی شده از همان خاک صورت پذیرد. همچنین در بررسی های آینده پیشنهاد می گردد که مراحل حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نیز متابولیت های تولید شده از این ترکیبات توسط باکتری ها مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین تمامی همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی این دانشگاه به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Nie M, Zhang XD, Wang JQ, Jiang LF, Yang J, Quan ZX, Cui XH, Fang CM, Li B. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. Soil Biol Biochem. 2009; 41(12): 2535-2542.

2. Jacobsen CS. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) in 2,4-D contaminated soil. Plant and Soil. 1997; 189(1): 139-144.

3. Kaksonen AH, Jussila MM, Lindstrom K, Suominen L. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. Soil Biol Biochem. 2006; 38(4): 817-827.

4. Johnsona DL, Anderson DR, McGratha SP. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. Soil Biol Biochem. 2005; 37(12): 2334-2336.

5. Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric poly cyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. Water Air Soil Poll. 1991; 60: 279-300.

6. Niel P. Environment Chemistry. 2 nd .Chapman and Hall London SE1 8HN, UK. 1995.

7. World Health Organization. Selected non heterocyclic poly cyclic aromatic hydrocarbons environmental health criteria 202 international program on chemical safety WHO Geneva, 1998.

8. US-EPA. Code of Federal Regulation Title 40 part 60 Subparts D Da Db Dc. Environmental Protection Agency. Washington DC, 1997.

9. Su YH, Yang XY. Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil. Sci Total Environ. 2009; 407(3): 1027-1034.

10. Haritash AK, Kaushid CP. Biodegradation aspects of poly aromatic hydrocarbons (PAHs). J Hazard Mater. 2009; 169(1-3): 1-15.

11. Aitken MD, Stringfellow WT, Nagel RD, Kazunga C, Chen SH. Characteristics of Phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Can J Microbiol. 1998; 44(8): 743-752.

12. Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. 2004; 57(5): 401-412.

13. Ma J, Xu L, Jia L. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. JM2 isolated from active sewage sludge of chemical plant. J Environ Sci. 2012; 24(12): 2141-2148.

14. Maiti A, Das S, Bhattacharyya N. High gelatinase activity of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria *Bacillus weihenstephanensis* strain AN1. J Pharm Res. 2013; 6(1): 199-204.

15. Rhoades JD. Cation exchange capacity. Methods of soil analysis, part 2. American Society Agronomy, 1986.

16. Jacques RJ, Okeke C, Bento M, Peralba M, Camargo A. Improved enrichment and isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons PAH-degrading microorganism in soil, using Anthracene as model PAH. Curr Microbiol. 2009; 58(6): 628-634.

17. Lee SH, Lee WS, Lee CH, Kim JG. Degradation of Phenanthrene and Pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. J Hazard Mater. 2008; 153(1-2): 892-898.

18. Neuman G, Teras R, Monson L, Kivisaar M, Schauer F, Heipieper HJ. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. Appl Environ Microb. 2004; 70(4): 1907-1912.

19. Eskandary S, Tahmourespour A, Hoodaji M. Investigation of growth and removal of phenol by isolation of bacterium from industrial waste water in vitro. Journal of Water Wastewater. 2011; 78: 78-85. [In Persian]

20. Holt G, Krieg R, Sneath A, Staley T, Williams T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins publisher. 1994; 450 p.

21. Mcpherson MJ, Muller S. Polymerase Chain Reaction, Bios scientific publisher. New York: Oxford. 2000; 250p.

22. Banks MK, Govindaraju RS, Schwab AP, Kulakow P. Field demonstration. In: Fiorenza S, Oubre CL, Ward CH (Eds.). Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 2000; pp. 3-88.

23. United State Environmental Protection Agency (USEPA). Office of solid waste Washington DC 20460, polycyclic aromatic hydrocarbons. 2008.

24. Toledo FL, Calvo C, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Syst Appl Microbiol. 2006; 29(3): 244-252.

25. Thenmozhi R, Praveenkumar D, Priya E, Nagasathy A, Thajuddin N. Evaluation of aromatic and polycyclic hydrocarbon degrading abilities of selected bacterial isolates. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012; 2(3): 445-449.

26. Dean-Ross D, Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. FEMS Microbiol Lett. 2001; 204(1): 205-211.

27. Eman AHM, Naeima MHY, Azza GF. Isolation and molecular identification of poly aromatic hydrocarbons-utilizing bacteria from crude petroleum oil samples. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(49): 7479-7484.

28. Yuan SY, Chang SW, Chang BV. Biodegradation of poly cyclic aromatic hydrocarbons in sludge. Bull Environ Contam Toxicol. 2003; 71(3): 625-632.

29. Tebyanian H, Hassanshahian M, Kariminik A. Identification of alkane hydroxylase gene in aliphathic-degrading bacteria isolated from waste oil. J Microb World. 2013; 5(3&4): 105-114.

30. Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top EM, Springael D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(4): 1944-1955.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 1, April 2013

Original Article

Bioremediation potential of indigenous gram-positive bacteria isolated from contaminated soil with polycyclic aromatic hydrocarbons

Somayyeh Eskandari[1], Mehran Hoodaji[2], Arezoo Tahmourespour[3], Atoosa Abdolahi[4]

[1] Ph.D. candidate, Department of Soil Sciencees, Khorasgan-Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Soil Sciencees, Khorasgan-Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Basic Medical Science, Khorasgan-Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[4] Assistant Professor, Department of Chemistry, Khorasgan-Isfahan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were extensively spread in the environment and are regarded as one of the mutagenic and carcinogenic agents on living creatures. Among the vast variety of procedures for the elimination of contamination, biological removal is capable of transmuting pollutants into innocuous and nontoxic substances using less amount of energy, chemicals and time. The study was aimed at evaluating the possibility of growth of the indigenous bacteria isolated from oil-polluted soils, in the presence of PAH compounds in the laboratory, and also identifying them by using the method of PCR.

Material and Methods: Specimens of the research were isolated from environmental gasoline and oil-polluted soils from the Isfahan City refinery. Initially, the native bacteria were separated from the contaminated soil with such compounds by utilizing a basic medium containing the concentration of 12.8 mg/l in 16 PAH compounds. Then, those bacteria which were able to grow and reproduce in the presence of the compounds identified through biochemical experiments and determination of genome sequence and consequently registered as new species.

Results: The results obtained in the study substantiated that approximately 13.3% of the total heterotrophic bacteria possess a degradable ability of the hydrocarbons. After the evaluation of biochemical tests and gene sequencing, it was disclosed that the isolated indigenous bacteria belonged to *Bacillus licheniformis* ATHE9, *Bacillus mojavensis* ATHE13 and a particular species of *Bacillus* (ATHE10).

Conclusion: The results of the present research verify the importance and proficiency of the native bacteria in the terms of the elimination of PAHs pollutions in contaminated areas.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polluted soils, Bioremediation, Polymerase Chain Reaction.

Correspondance to: Somayyeh Eskandari
Tel: +989133883010
E-mail: Eskandary.s@gmail.com
Journal of Microbial World 2013, 6(1): 34-44.