ORIGINAL ARTICLE

Anthracene Biodegradation by Bacteria Isolated from Tajan River Estuary

Zabihollah Yousefi[1],
Reza Safari[2],
Shahabeddin Sarvi[3],
Reza Ali Mohammadpour Tahmtan[4],
Ehsan Rostamali[5]

[1] Professor, Department of Environmental Health, Health Sciences Research Center, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Caspian Sea Ecology Research Center, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Department of Environmental Health, Health Sciences Research Center, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MSc Student in Environmental Health, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 12, 2014 ; Accepted September 23, 2014)

Abstract

Background and purpose: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) are environmental pollutants that are caused by human activity and considered as carcinogenic and mutagenic compounds. Anthracene is a hazardous substance causing serious health problems. There are many bacteria with the ability to remove this pollutant. The aim of of this study was isolation of some bacteria from Tajan river estuary and their use in biodegradation of Anthracene.

Materials and methods: In this study the samples taken from estuaries were inoculated into a synthetic medium culture. Four species of bacteria were isolated in the culture process and applied for removal of Anthracene in different environmental conditions such as pH, time, temperature and concentration of Anthracene. Spectrophotometer and HPLC were used to study the growth of bacteria and Anthracene concentration, respectively.

Results: The results showed that, optimum condition for removal of Anthracene was pH= 7, temperature= 30 °C, and the dose of inoculated bacteria 10^7 cfu/ml. Anthracene concentration was 100 ppm. Efficiency of the Anthracene removal in the presence of Pseudomonas putida, Achrobactrum haematophilum, Klebsiella oxytoca, Enterococcus sp, was obtained 51, 45, 43 and 48 percent, respectively. Pseudomonas putida bacteria species had the highest efficiency in Anthracene removal and Enterococcus sp strains had the lowest efficiency.

Conclusion: The biological method is a cheap and effective method that can be used for Anthracene removal.

Keywords: Anthracene, biodegradation, Tajan river

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(118): 112-123 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۸ آبان سال ۱۳۹۳ (۱۲۳-۱۱۲)

بررسی میزان تجزیه بیولوژیک آنتراسن (Antheracen) توسط باکتری‌های جداسازی شده از مصب رودخانه تجن

ذبیح اله یوسفی[۱]
رضا صفری[۲]
شهاب الدین سروی[۳]
رضاعلی محمدپور تهمتن[۴]
احسان رستمعلی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک (PAHs) آلاینده‌های زیست محیطی‌اند که عموماً در اثر فعالیت‌های انسانی ایجاد و به عنوان ترکیبات سرطان‌زا و جهش زا مورد ملاحظه قرار می‌گیرند. آنتراسن یک نوع از این آلاینده خطرناک است. باکتری‌های زیادی توانایی حذف این آلاینده را دارند. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های مربوطه از مصب رودخانه تجن و استفاده از آن‌ها جهت تجزیه بیولوژیکی آنتراسن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک پژوهش کاربردی است. نمونه‌ها از مصب رودخانه تجن اخذ و به محیط کشت مصنوعی تلقیح شد. چهار گونه باکتری از فرآیند کشت جداسازی شدند و سپس برای دفع آنتراسن در شرایط مختلف محیطی مثل pH، زمان، دما و غلظت آنتراسن بکار رفت. اسپکتروفوتومتر و HPLC برای مطالعه رشد باکتری ها و غلظت باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد شرایط بهینه برای دفع آنتراسن عبارت از pH=۷، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دوز باکتری تلقیحی $۱۰^{۷}$ کلنی در میلی لیتر بودند. غلظت آنتراسن ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود. راندمان دفع آنتراسن درحضور گونه‌های باکتری سودوموناس پوتیدا اگروباکتریوم هماتوفیلوم، کلبسیلا اکسیتوکا، انتروکوکوس sp به ترتیب ۵۱، ۴۳، ۴۵ و ۴۸ درصد به دست آمد. گونه سودوموناس پوتیدا دارای بیش‌ترین کارآیی دفع آنتراسن بوده است و گونه انتروکوکوس sp نیز از کم‌ترین راندمان برخوردار بود.

استنتاج: روش بیولوژیکی روشی ارزان و مؤثر است که می‌تواند برای حذف آنتراسن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتراسن، تجزیه بیولوژیکی، رودخانه تجن

مقدمه

هیدروکربن‌های چند حلقه‌ایی آروماتیک (PAHs)[۱]، ترکیبات کارسینوژن و موتاژنی هستند که اغلب به صورت مخلوط‌های پیچیده در محیط وجود داشته و به ندرت به حالت منفرد دیده می‌شوند. این ترکیبات معمولاً بی‌رنگ تا سفید یا زرد کمرنگ بوده و در رنگ‌سازی، پلاستیک‌سازی، آفت‌کش‌ها و آسفالت

1. Polycyclic aromatic hydrocarbon

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۶۱- ۹۲ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: احسان رستمعلی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده بهداشت E-mail:er_3656@yahoo.com
۱. استاد، گروه بهداشت محیط، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. پژوهشکده اکولوژی خزر، مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموزیس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، گروه بهداشت محیط، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

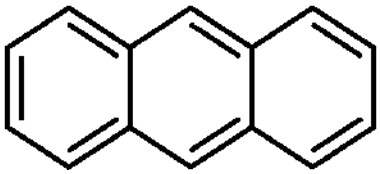
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۵/۱ تاریخ تصویب :۱۳۹۳/۷/۲

جاده‌ها به کار می‌روند(۱). ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای عموماً حاصل فعالیت‌های انسانی هستند. دودکش صنایع، اگزوز اتومبیل‌ها، زباله سوزها، وسایل گرم کننده و نشت از مخازن، از منابع مهم آلودگی محیط توسط PAHs می‌باشند(۲). تاکنون ۱۶ ترکیب PAHs در فهرست سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا، به عنوان آلاینده‌های مهم جای گرفته است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نفتالین، آنتراسن، فنانترن، فلورن، کریزن، فلورانتن، پیرن و مشتقات آن‌ها اشاره کرد(۴).

آنتراسن با ۳ حلقه آروماتیک در محیط آبی ایجاد سمیت می کند. دارای ساختمان کریستالی و رنگ زرد کم رنگ می باشد. هم‌چنین دارای بوی ضعیف آروماتیکی می‌باشند که در میان ترکیبات محیط زیست معمول می‌باشد. آنتراسن یکی از PAHs نسبتاً کوچک می‌باشد که یک جامد قابل احتراق است و نقطه قابل احتراق ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد دارد. آنتراسن مانند بسیاری از PAHs در تولید رنگ‌های سریع الاثر، فیبر و پلاستیک کاربرد دارد. هم‌چنین از آنتراسن در حشره‌کش‌ها و مواد نگهدارنده چوب استفاده می شود. این ترکیب دارای فراوانی بسیار می‌باشد(۴).

آنتراسن از منابع مختلفی مانند منابع غیر نقطه‌ای (NON POINT) و نیز از خروجی فاضلاب صنایع ساخت رنگ و آفت کش می‌توانند وارد محیط زیست شوند. همان‌طور که از لیست مواد سمی رها شده بر می‌آید، اکثر آنتراسن رها شده وارد هوا می‌شود.

منابع تولید آنتراسن: زغال و قیر هستند که در اثر احتراق ناقص ترکیبات آلی حاصل می‌شود، بنابراین می‌تواند از اگزوز اتومبیل‌ها، چمن زن‌ها و کباب کن‌های زغالی (قطران زغال سنگ) خارج شود. هم‌چنین آن‌ها می‌توانند از طریق توده‌های زغال وارد زمین و آب‌های سطحی شوند تماس با آنتراسن می‌تواند سبب سوزش پوست و چشم شود که در معرض نور خورشید شدیدتر می‌شود. تماس مکرر با آنتراسن ممکن است سبب تغییر در رنگ دانه‌های پوست و نیز رشد سرطانی آن‌ها شود: اگر چه هیچ‌گونه اطلاعاتی راجع به سرطان زایی آنتراسن وجود ندارد. استنشاق آنتراسن بر روی فعالیت‌های تولید مثلی انسان وجود دارد و ممکن است آنتراسن سبب ایجاد جهش در سلول‌ها شود. تصویر شماره ۱ ساختار آنتراسن را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۱: Anthracene

آنتراسنی که در زمین پخش می‌شود، جذب خاک می‌گردد. این حداقل خطر به وجود آمده برای آلودگی آب‌های زیرزمینی است. آنتراسن در خاک مورد تجزیه زیستی قرار می‌گیرد. هم‌چنین آنتراسن هیدرولیز نمی‌شود که علت آن حضور گروه‌های عاملی (Functional Group) می‌باشد. نیمه عمر آنتراسن رها شده در خشکی که مورد تجزیه زیستی قرار می‌گیرد، در حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ روز می‌باشد. بیش‌ترین میزان آنتراسن به هوا وارد و یا بخار می‌شوند و یا جذب مواد ذره‌ای می‌شوند. آن‌ها سریعاً تحت تأثیر فتولیز قرار می‌گیرند که با توجه به سرنوشت جوی خود نیمه عمر کوتاهی دارند که بسته به درجه جذب آن‌ها از چند ساعت تا چند روز متغیر است(۵). ترکیب جذب نشده دارای نیمه عمر کوتاه‌تری از ترکیب جذب شده می‌باشد و درشرایط طبیعی به وسیله میکروارگانیسم های بومی تجزیه می‌شود ولی این پروسه طولانی بوده(۵) و در نتیجه نیاز به توسعه تکنیک‌های پاک‌سازی ساده و با صرفه برای محیط‌های آلوده به PAHs امری بدیهی است. در سال های اخیر تجزیه بیولوژیک توسعه چشمگیری یافته و به عنوان یک راهکار اقتصادی برای پاکسازی محیط‌های آلوده به PAHs با استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده، مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱). توانایی باکتری‌ها در محیط به منظور تجزیه زیستی آنتراسن، به

سازگاری باکتری‌های تجزیه کننده در محیط‌های آلوده بستگی دارد. PAHs دو یا سه حلقه‌ای نسبت به ترکیبات آروماتیک با تعداد بیش‌تر حلقه‌های آروماتیک به خوبی تجزیه می‌شوند و باکتری‌های مختلف توانایی تجزیه این گونه ترکیبات را دارند و از آن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند(۶). با توجه به این که مطالعات کمی بر روی باکتری‌های بومی ناحیه خزری در شمال ایران انجام گرفته است، هدف از این مطالعه تجزیه بیولوژیکی آنتراسن توسط باکتری‌های جدا شده از رسوبات بستر مصب رودخانه تجن و شناسایی گونه‌های بومی دارای قابلیت استفاده از آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن برای به کارگیری در پاکسازی بیولوژیکی منابع آب و خاک آلوده به PAHs در منطقه بود. علت انتخاب رسوب بستر مصب رودخانه تجن این بود که بسیاری از PAHs به ذرات جامد متصل شده و در رودخانه‌ها به صورت رسوبات رودخانه‌ای تجمع می‌یابند، به طوری که رسوبات رودخانه‌ای منبع اصلی این ترکیبات در منابع آبی محسوب می‌شوند. از طرف دیگر جمعیت باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری در مصب رودخانه به مراتب بیش تر از ستون آب رودخانه می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری در تیر ماه ۱۳۹۲ با استفاده از گرپ از رسوب رودخانه تجن در چندین نقطه از منطقه مصب انجام گرفته شد. نمونه‌ها در کم‌تر از ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه انتقال یافت و نسبت به انجام آزمایشات اقدام گردید(۷). کلیه مواد مورد استفاده در پژوهش ساخت شرکت مرک (آلمان) بوده به جز مواردی که در مقاله ذکر می‌شود.

دستیابی به استوک خالص باکتری‌های تجزیه کننده آنتراسن

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و تهیه رقت‌های متوالی، کشت در محیط حداقل MSM[1] انجام گرفت. ترکیب محیط کشت عبارت بود از:

$(NH_4)_2SO_4$ ۲ گرم، $MgSO_4\ 7H_2O$ ۲ گرم، $CaCl_2\ 2H_2O$ ۰/۰۱ گرم، $FeSO_4\ 7H_2O$ ۰/۰۰۱گرم، $Na_2HPO_4\ 12\ H_2O$ ۱/۵ گرم، KH_2PO_4 ۱/۵ گرم در لیتر. PH نهایی با استفاده از اسید سولفوریک و سود ۱ نرمال بر روی ۷ تنظیم و سپس در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و آنتراسن (به عنوان تنها منبع کربن ۵۰ ppm) به محیط اضافه شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در انکوباتور شیکر دار در ۱۲۰ دور در دقیقه و رشد باکتری‌های کشت داده در محیط حداقل (ظاهر شدن کدورت)، متعاقباً کشت در محیط MSM آگار دارای آنتراسن (به عنوان تنها منبع کربن) انجام گرفت. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳ روز و رشد کلنی‌های شاخص در محیط آگاردار، با استفاده از مشخصات ماکروسکوپی، میکروسکوپی باکتری‌های تجزیه کننده مشخص شدند. استوک به دست آمده جهت شناسایی بیولوژیکی و بررسی راندمان حذف مورد استفاده قرار گرفت(۴، ۵، ۶).

تهیه و آماده سازی باکتری تلقیحی به محیط مایع جهت بررسی راندمان حذف

برای تهیه باکتری تلقیحی، هر یک از ایزوله‌ها در ارلن مایر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط مایع، محیط کشت BHI[2] کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ[3] SIGMA 16-3K ساخت کشور آلمان قرار داده شد و پس از تخلیه مایع رویی، به رسوب باقی‌مانده ۱۰ cc سرم فیزیولوژی اضافه و مجددا سا نتریفیوژ شد. (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه). ۳ بار این مرحله تکرار شد. در مرحله آخر مجددا به رسوب باقی‌مانده ۱۰cc سرم

1. mineral salts medium
2. Brain Heart Infusion
3. Centrifuge

فیزیولوژی اضافه شد و پس از مخلوط کردن، کدورت سوسپانسیون با کدورت لوله‌های استاندارد مک فارلند مقایسه شد و غلظت باکتری 10^7 عدد در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تخمین زده شد.

تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در محیط مایع

آزمایش تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM براث حاوی آنتراسن (به عنوان تنها منبع کربن) انجام گرفت که در آن دوزهای مشخصی (۷ درصد) از استوک خالص باکتری (به صورت منفرد) و غلظت آلاینده (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و زمان تماس (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) به عنوان متغیرهای مطالعه بر روند تجزیه مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه شاهد نیز بدون تلقیح باکتری با ۳ غلظت در نظر گرفته شد تا اثر سایر عوامل در حذف زیستی آنتراسن متمایز شود. pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد و نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. به منظور بررسی روند تجزیه، تغییرات رشد باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

جهت بررسی غلظت باقی‌مانده آنتراسن پس از تجزیه توسط باکتری‌ها از دستگاه HPLC (آلمان KNAUER) استفاده شد(۸). حلال‌های دستگاه استونیتریل و آب به نسبت ۹۰ به ۱۰ به عنوان فاز متحرک با شدت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه، ستون C18 و دتکتور UV استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت و مرز معنی‌داری در سطح $p>0/05$ قرار داده شد.

شناسایی مولکولی جنس و گونه باکتری

برای شناسایی جنس و گونه باکتری‌های تجزیه‌کننده آنتراسن از ژن 16Sr DNA استفاده شد. برای استخراج DNA باکتری‌ها ۱۰ میلی‌لیتر از کشت تازه ۲۴ ساعته در محیط TSB براث در سانتریوفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و بر روی کلنی‌های رسوب داده شده با استفاده از کیت استخراج DNA (Dynabio, Iran) عمل استخراج انجام گرفت و برای ژن مذکور واکنش PCR انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده به صورت زیر بود(۹، ۱۰).

پرایمر رفت (16F27)
(5′CCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′)

پرایمر برگشت (16R1488)
(5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

در این مطالعه از PCR PreMix (ساخت شرکت BIONEER کره جنوبی) استفاده شد که ترکیبات آن در جدول شماره ۱ آمده است. مخلوط واکنش (۲۰µl) حاوی ۱ میکرو مول از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA tempelat واکنش pcr در دستگاه ترموساکلر مدل (peqlab, primus96 advanced gradient) ساخت کشور آلمان با برنامه زیر انجام شد:

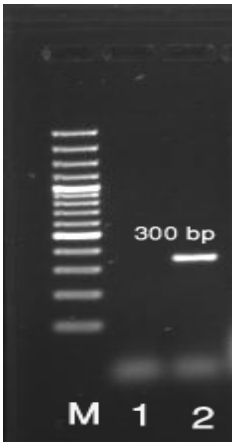
۱- دناتوراسیون اولیه ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه
۲- ۳۰ سیکل: (دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمر ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، افزایش طول رشته‌ها در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه)
۳- افزایش طول نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه

جدول شماره ۱: غلظت ترکیبات در PCR Premix

ترکیبات	غلظت
Top DNA polymerase	۱U
Each: dNTP(dATP , dCTP , dGTP , dTTP)	۲۵۰µM
Tris-HCL(PH9.0)	۱۰mM
KCL	۳۰mM
$Mgcl_2$	۱/ ۵ mM

جهت آنالیز نهایی محصول PCR، µl ۵ از آن روی ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE برده شد و اختلاف پتانسیل v ۱۰۰ به مدت یک ساعت برقرار شد. بعد از

الکترو فورز محصول PCR و مشاهده در زیر نور uv تصویر ژل با استفاده از دستگاه gel document تهیه گردید (تصویر شماره ۲). به منظورتعیین اندازه محصولات نشانگر 100-bp plus ladder) ساخت شرکت BIONEER) به کار برده شد. پس از به دست آمدن باندهای مورد نظر، باندها جهت توالی یابی مورد استفاده قرارگرفت(۱۳، ۲۱،۲۰). برای هر یک از نمونه‌ها مقدار ۳۰ میکرولیتر محصول PCR به همراه پرایمرهای Forward و Reverse هر کدام به مقدار ۲۰ میکرولیتر و غلظت ۲۰ میکرومول در تیوپ‌های جداگانه برای تعیین توالی به شرکت BIONEER کره جنوبی در کنار یخ ارسال گردید. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی (به روش سانگر) و تطبیق (BLAST) در ژن بانک NCBI[1] گونه‌های جداسازی شده شناسایی شد(۹،۱۰).



تصویر شماره ۱:الکتروفورز محصول PCR حاصل از DNA باکتری با استفاده از پرایمر اختصاصی. M: مارکر DNA ۱۰۰bp.۱: کنترل منفی. ۲:نمونه باکتری

یافته ها

جدا سازی باکترهای تجزیه کننده آنتراسن

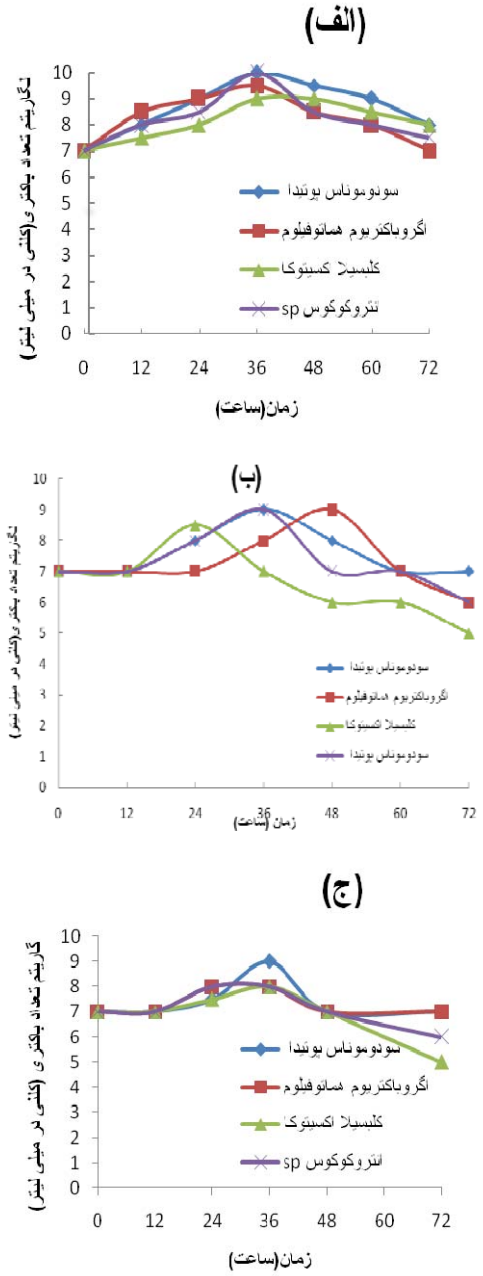
۴ سویه باکتری سودوموناس پوتیدا[2] با شماره شناسایی HQ018734.1، اگروباکتریوم هماتوفیلوم[3] با شماره شناسایی KJ009247.1، کلبسیلا اکسیتوکا[4] با شماره شناسایی KC936222.1، انتروکوکوس sp[5] با شماره شناسایی KF300531.1 در محیط MSM حاوی آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی رشد کردند که با انجام آزمایشات PCR جنس و گونه سویه‌ها شناسایی شدند.

پس از کشت باکتری های شناسایی شده در محیط MSM براث حاوی آنتراسن با سه غلظت مشخص در دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، PH ۷، زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و دوز باکتری تلقیحی ۷ درصد، نتایج به دست آمده به صورت زیر بود:

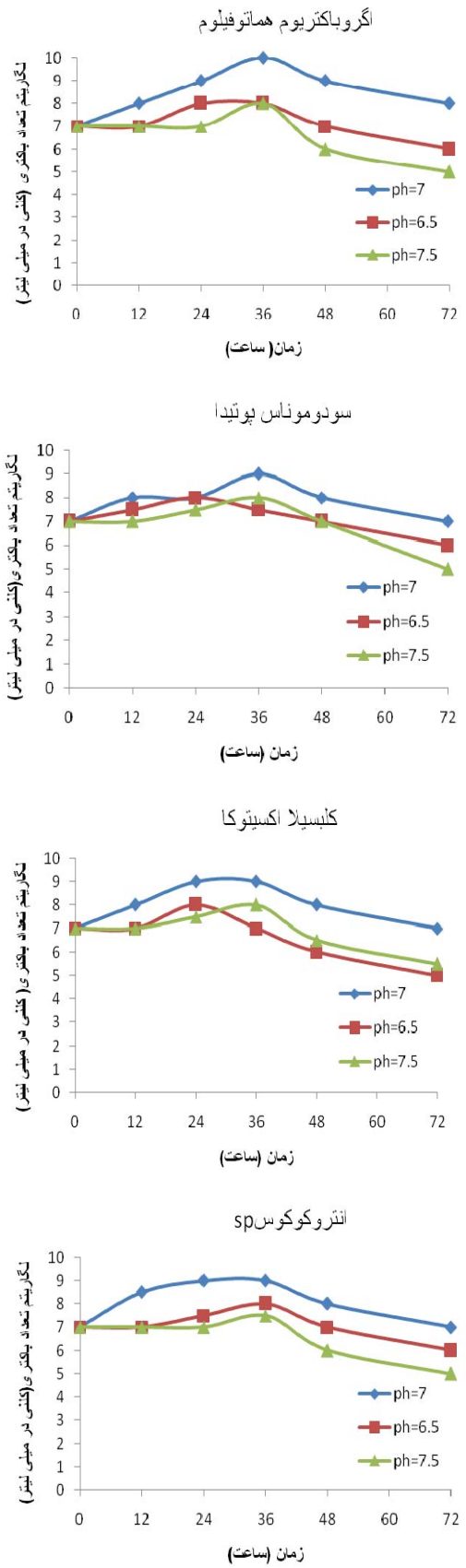
نمودار شماره ۱ منحنی رشد باکتری‌های جداسازی شده را در حضور غلظت‌های مختلف آنتراسن در مدت ۳ روز نشان می‌دهد که مطابق این نمودار، هر ۴ کشت بهترین رشد را در غلظت ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر داشتند. طبق این نمودار باکتری‌ها پس از ۱۲ ساعت شروع به رشد کردند و این افزایش رشد تا ۳۶ ساعت ادامه داشت که نشان دهنده این است که باکتری ها از آنتراسن به عنوان منبع کربن استفاده کرده اند و پس از افزایش رشد، در فاز رشد ثابت قرار گرفتند و با افزایش زمان انکوباسیون، رشد باکتری‌ها روند نزولی پیدا کردند که این تغییر با کاهش غلظت آنتراسن همراه بود به عبارت دیگر اگر باکتری در هنگام رشد، به صورت لگاریتمی افزایش یابد، در ۲۴ ساعت اول بیش ترین فعالیت تجزیه‌کنندگی را دارد و غلظت آنتراسن را به طور چشم‌گیر کاهش می‌دهد. نمودار شماره ۲ منحنی رشد باکتری‌های جداسازی شده را در pH های مختلف نشان می‌دهد که نتایج حاکی از آن است که pH بهینه رشد، ۷ می‌باشد. نمودار شماره ۳ منحنی رشد باکتری‌ها از لحاظ دما را نشان می‌دهد و نشان‌دهنده این است که هر ۴ گونه بهترین رشد را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارند. در نمودار شماره ۴ دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH= ۷ و دوز باکتری تلقیحی کلنی در $۱۰^{۷}$ میلی لیتر و

1. National Center for Biotechnology Information
2. Pseudomonas putida
3. Achrobactrum haematophilum
4. Klebsiella oxytoca
5. Enterococcus sp

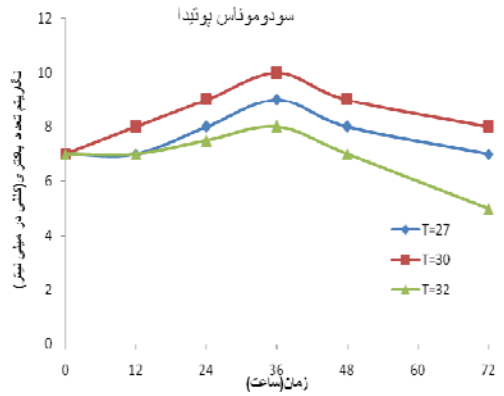
غلظت آنتراسن ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان بهینه در نظر گرفته شد و راندمان حذف بررسی شد. میزان حذف آنتراسن در حضور گونه‌های سودوموناس پوتیدا، اگروباکتریوم هماتوفیلوم، کلبسیلا اکسیتوکا، انتروکوکوس sp به ترتیب ۵۱، ۴۳،۴۵ و ۴۸ درصد می‌باشد که بیش‌ترین حذف را گونه سودوموناس پوتیدا وکم ترین حذف را گونه انتروکوکوس sp انجام دادند.



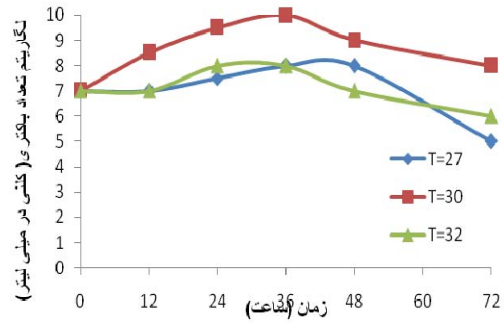
نمودار شماره ۱: لگاریتم تعداد کلنی باکتری‌ها در میلی‌لیتر در حضور آنتراسن (الف) ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر (ب) ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (ج) ۳۰۰ میلی‌گرم لیتر



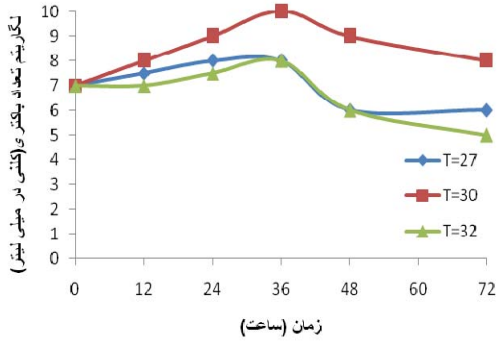
نمودار شماره ۲: منحنی رشد باکتری های جدا شده در pH (۶/۵، ۷، ۷/۵)



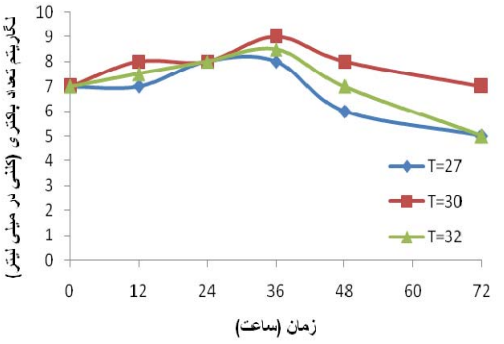
اگروباکتریوم هماتوفیلوم



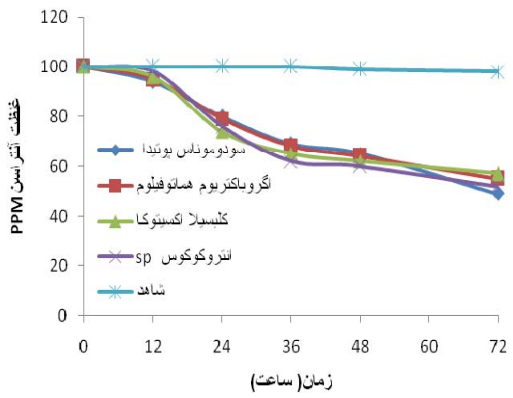
کلبسیلا اکسیتوکا



انتروکوکوس sp



نمودار شماره۳ منحنی رشد باکتری ها از لحاظ دما



نمودار شماره ۴: تغییرات غلظت آنتراسن در حضور ۴ گونه باکتری

بحث

آلودگی نفتی در دریای خزر بسیار بالاست و مقادیر زیادی از ترکیبات نفتی در این محیط وجود دارند. مثلاً در منطقه باکو در آذربایجان سالیانه مقادیر زیادی از ترکیبات نفتی وارد دریای خزر می‌شود، به‌طوری‌که خلیج باکو یکی از آلوده‌ترین مکان‌های دریای خزر است(۱۷).

ازآن‌جاکه یکی از بهترین راه کارهای اصلاح زیستی، روش‌های بیولوژیک می‌باشد و بسیاری از سازمان‌های جهانی استفاده از آن را برای اصلاح محیط‌های آلوده شده با آلاینده‌های محیطی ترویج می‌کنند، دستیابی به گونه‌های بومی دارای قابلیت بالای تجزیه ترکیبات آروماتیک ضروری می‌باشد. در این تحقیق پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده آنتراسن از مصب رودخانه تجن، راندمان حذف هیدروکربن آنتراسن و پارامتر های موثر در تجزیه بیولوژیک توسط این میکروارگانیسم‌ها بررسی و مقادیر مختلفی از تخریب مشاهده شد.

در کلیه آزمایشات راندمان با افزایش زمان ماند افزایش یافته است. همان‌گونه که مشاهده شد علت این که زمان به صورت خطی معنی‌دار و و مثبت بود، این است که با افزایش زمان، راندمان حذف افزایش یافته است علت افزایش حذف با افزایش زمان ماند این است که با گذشت زمان، باکتری ها بیوسورفاکتانت بیش تری ترشح می‌کنند که باعث می‌شود PAHs به میزان

بیش‌تری در دسترس باکتری ها قرار گیرند و در نتیجه قابلیت تجزیه افزایش می‌یابد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ در مصر بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شد، Arab و همکارانش گونه‌های تجزیه کننده و راندمان حذف را بررسی کردند و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس[1] را با راندمان ۹۱/۵ درصد به عنوان توانمند ترین گونه در تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک گزارش کردند(۵). در این مطالعه باکتری‌ها پس از ۱۲ ساعت شروع به رشد کردند و پس از ۱۲ ساعت وارد فاز رشد شدند که تا ۳۶ ساعت ادامه داشت. سپس رشد باکتری‌ها کاهش یافت و توانمندترین گونه آنتراسن را با راندمان ۵۱ درصد حذف نمود که کاملاً با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تجزیه بیولوژیکی ترکیبات آروماتیک از جمله آنتراسن توسط باکتری‌های جدا شده از محیط‌های طبیعی انجام گرفته است. در سال ۱۹۹۸، چرچیل و همکاران موفق به جداسازی سویه مایکوباکتریوم با توانایی استفاده از هیدروکربن‌های سه و چهار حلقه‌ای شدند که در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق نتایج حاصل از هر دو پژوهش تأییدی بر دیگری بود(۷).

در سال ۱۳۸۷ یعقوب‌زاده موفق به تجزیه بیولوژیکی نفتالن با راندمان بالای ۹۰ درصد با استفاده از باکتری‌های جدا شده از آب دریای خزر شد(۱۸). در تحقیقات دیگری که در نیجریه در سال ۲۰۱۰ با هدف جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات سه و چهار حلقه‌ای مانند آنتراسن، فنانترن یا پیرن بر روی محیط آبی انجام شد، Oluwafemi و همکاران توانستند سویه‌های باکتریای مایکوباکتری[2] و ساکاروتری[3]، گوردونا[4] و رودوکوکوس[5] را به عنوان باکتری توانمند در تجزیه پیرن جداسازی کنند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در سویه جدا شده با توانایی رشد بر روی پیرن، فنانترن و فلورانتن، یک پلاسمید بزرگ یافت شد. نتایج نشان داد که پلاسمیدها نقش اصلی را در تکامل توانایی تجزیه در بین میکروارگانیسم‌ها ایفا می‌کنند. آن‌ها به جمعیت‌های باکتریایی اجازه دسترسی به انتقال ژن که ممکن است برای بقای آن ها مهم باشد، را می‌دهند(۱۱). هم‌چنین به طور وسیعی در اکوسیستم آبی و خاکی تجزیه هیدروکربن پیرن به وسیله باکتری‌ها گزارش شد. در مطالعات دیگر که در کارولینا آمریکا توسط KAZUNGA و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، محصولات متابولیسم ناقص پیرن به وسیله چندین سویه باکتریایی متفاوت مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان داد که باکتری‌ها توانایی تجزیه PAHs به مواد کم خطرتر را دارند(۱۲). هم چنین در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ در سواحل کاراییب توسط باکار Zaidi و همکاران انجام شد، گونه غالب تجزیه‌کننده فنانترن آنتروباکتر معرفی و عوامل مداخله‌گر شناسایی شد(۴). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Coral و همکاران انجام گرفت عامل اصلی قابلیت تجزیه توسط باکتری‌ها را وجود نوعی پلاسمید اعلام کردند که باکتری‌ها توانایی مقاومت و تجزیه کنندگی خود را از طریق این پلاسمید انتقال می‌دهند(۱۳).

همان‌طورکه در نتایج آمده است، در تمامی آزمایشات با افزایش غلظت اولیه آلاینده، راندمان حذف کاهش یافته است و برای آنتراسن راندمان حذف با افزایش غلظت کاهش یافته است که این مطلب با بسیاری از مطالعات انجام شده مطابقت دارد که علت آن کاهش توانایی رشد باکتری‌ها هنگام افزایش غلظت می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۰ توسط کفیل زاده و همکاران در شیراز انجام شد، موفق به جداسازی باکتری‌های مختلف تجزیه کننده پیرن از خاک‌های محل دفن زباله شدند که همگی رشد خوبی بر روی

1. Lactobacillus bulgaricus
2. Mycobacterium
3. Sacro Tera
4. Gordona
5. Rodococos

محیط پایه نمکی از خود نشان دادند. سویه‌های جدا شده سودوموناس، میکروکوکوس، مایکوباکتریوم و باسیلوس‌ها بودند. در نتایج این مطالعه رشد پایین باکتریایی در غلظت‌های بالای ترکیبات آروماتیکی مشاهده گردید که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. علت این امر سمیت PAHs در غلظت‌های بالا برای باکتری‌ها می‌باشد(۱۴) در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۹ در تبریز انجام شد، صدیق بیان و همکاران موفق به تجزیه بیولوژیکی نفتالن شده و متابولیت‌های ثانویه تولید شده رادی فنیل متان[1]، هیدروکسیتولوئن[2]، آلفا کادینول[3]، سیکلو هگزان[4] و اسید رتینوئیک[5] گزارش کردند(۱۵).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ در مصر بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شد، Arab و همکارانش گونه‌های تجزیه کننده و راندمان حذف را بررسی کردند و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (Lactobacillus bulgaricus) را با راندمان ۹۱/۵ درصد به عنوان توانمندترین گونه در تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک گزارش کردند. در این مطالعه باکتری‌ها پس از ۱۲ ساعت شروع به رشد کردند و پس از ۱۲ ساعت وارد فاز رشد شدند که تا ۳۶ ساعت ادامه داشت. سپس رشد باکتری‌ها کاهش یافت. توانمندترین گونه، آنتراسن را با راندمان ۵۱ درصد حذف نمود(۵).

در مطالعه‌ای که توسط صفاهیه و همکاران در منطقه خورموسی انجام گردید، گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا به عنوان توانمندترین گونه‌های تجزیه کننده نفتالن بیان شدند که میزان تجزیه بعد از ۱۲۰ ساعت به ترتیب ۹۶ درصد و ۹۱ درصد بوده است. علت راندمان بیش‌تر حذف نفتالن نسبت به آنتراسن در این مطالعه، کم‌تر بودن تعداد حلقه آروماتیک نفتالن می‌باشد. هر چه تعداد حلقه آروماتیک PAHs بیش‌تر باشد، خاصیت آب‌گریزی بیش‌تر و در نتیجه نسبت به تجزیه بیولوژیکی مقاوم تر می‌شوند(۱۶).

در مطالعه‌ای دیگر که در حوزه نفتی سیری واقع در خلیج فارس توسط امتیاز جو و همکاران انجام شد، میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آنتراسن جداسازی شدند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد(۱۷).

در این تحقیق روش آماری در نظر گرفته شده روش بهینه بود که بر خلاف روش آماری فاکتوریل تک تک متغیرها به تنهایی مورد بررسی قرار گرفت. روند تغییرات میزان تجزیه آنتراسن در PH های مختلف بررسی شد، همان گونه که در جداول مشاهده شد، بیش‌ترین تجزیه آنتراسن در PH برابر۷ انجام شد. لذا PH بهینه برای ادامه آزمایشات برابر ۷ انتخاب شد و تمامی آزمایشات بعدی در PH برابر ۷ انجام شد. هم چنین بیش‌ترین تجزیه آنتراسن در دمای انکوباسیون ۳۰ درجه انجام شد که علت رشد بیش‌تر باکتری‌ها در این دما می‌باشد. با توجه به نتایج این طرح، باکتری‌های جدا شده از رسوبات بستر رودخانه تجن، پتانسیل و قدرت تخریب و تجزیه آنتراسن را در شرایط آزمایشگاهی به طور قابل توجهی دارند که با توجه به سوابق تحقیقاتی انجام شده، این موضوع تأیید می‌شود. اگر چه ممکن است هیدروکربن‌های آروماتیک مثل آنتراسن در مدت زمان طولانی تجزیه شود، ولی این تجزیه در حضور باکتری‌هایی که توانایی تجزیه این ترکیبات را دارند، به طور چشمگیر و چندین برابر افزایش می‌یابد. متابولیت‌های تولید شده از باکتری‌ها (سورفکتانت‌ها) باعث ادامه و سهولت عملیات تخریب و تجزیه بیولوژیکی می‌گردد. از آن‌جایی که بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی در این منطقه مطالعه کمی انجام شده است، لذا تحقیق حاضر جدید می‌باشد و امید است نتایج این پژوهش در مطالعات بعدی و استفاده‌های کاربردی این ارگانیسم‌ها در محیط‌های آلوده مورد استفاده قرار گیرد.

1. Diphenylmethane
2. hydroxytoluene
3. Alpha-Cadinol
4. Cyclohexane
5. Retinoic acid

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مشترک فیمابین دانشگاه علوم پزشکی مازندران و پژوهشکده اکولوژی خزر بشماره طرح ۱۶۱-۹۲ و نیز پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط می باشد.

در پایان لازم است از مسئولان و همکاران گرامی آزمایشگاه های دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران و همکاران محترم پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر که در تمام مراحل اجرای این پروژه با ما همکاری داشتند، نهایت قدردانی را داشته باشیم.

References

1. Christopher W, Bentham RH, Gaskin ShE, Juhasz AL. Isolation and Identification of Pyrene Mineralizing Mycobacterium spp. from Contaminated and Uncontaminated Sources. Hindawi Publishing Corporation Applied and Environmental Soil Science 2011: (1-11).
2. Cripps C, Bumpus JA, Aust SD, Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by Phanerochaete chrysosporium. Appl Envioron Microbiol 1990; 56(4): 1114-1118.
3. LFeijoo-Siota, Rosa-Dos-Santos F, Miguel Td, Villa TG. Biodegradation of Naphthalene by Pseudomonas stutzeri in Marine Environments: Testing Cells Entrapment in Calcium Alginate for Use in Water Detoxification. Bioremediat J 2008; 12(4): 185-192.
4. Zaidi RB, Imam HS. Factors Affecting Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Phenanthrene in the Caribbean Coastal Water. Marine Pollution Bulletin 1999; 38(8):737-742.
5. Arab A, Salim AB, Maher RA, El-Hendawy HH, Awad AA. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Affected by some Lactic Acid Bacteria. J Am Sci 2010; 10(6): 1237-1246.
6. Churchill SA, Harper JP, Churchill PF Isolation and Characterization of a Mycobacterium Species Capable of Degrading Three-and Four-Ring Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. Appl Environ Microbiol 1999; 65(2): 549-552.
7. Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annal Microbiol 2005; 55(4): 255-259.
8. Yuting H, Fenghua R, Zhou P, Xia M, Liu Sh. Degradation of pyrene and characterization of Saccharothrix sp. PYX-6 from the oligotrophic Tianchi Lake in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. Chinese Science Bulletin 2003; 48(20): 2210-2215.
9. Samaei M, Mortazavi B, Bakhshi B, Jafari AJ. Isolation, genetic identification, and degradation characteristics of n-Hexadecane degrading bacteria from tropical areas in Iran. Fresenius Environmentall Bulletin 2013; 22(4): 1305-1312.
10. Lane DJ. 16S/23S sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Modern Microbiological Methods). Stackebrandt E, Goodfellow M, (eds). New York: Wiley. 1991. p. 115-175.
11. Oluwafemi SO, Lateef BS. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of

plasmids. Sci Res Essays 2010; 25(5): 4093-4106.

12. Kazunga CH, Aitken MD. Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. Appl Envioron Microbiol 2000; 66(5): 1917-1922.
13. Kafilzadeh F, Hoshyaripour F, Afrough A, Jamali H, Allahverdi GH. Isolation and identification of pyrene-degrading bacteria from soil near landfills in Shiraz and check their growth kinetics. J Fasa Univ Med Sci 2011; 1(3): 154-159 (Persian).
14. Sedighbayan KH, Dehnad A, Mobaiyen H, Modirshahla N, Naseri A. Investigation of capability of biological dissociation of naphthalene using soil bacteria in Tabriz refinery. Journal Microbial Biotechnology Research University 2010; 4(2): 13-20 (Persian).
15. Safahiyeh A, Mojoodi F, Zolgharnein H. Evaluation and Comparison of the Ability of Indigenous Pseudomonas Bacteria from Musa creek to remove poly Aromatic Compounds. Environmental Studies 2011; 37(58): 149-158 (Persian).
16. Emtiazjo M, Sedighi S, Emtiazjo M. Bioremediation of Anthracene in Siri Island basin of Persian Golf with emphasis on biosafety. Journal of Environmental Science and Technology 2009; 11(3): 257-268 (Persian).
17. Yaghobzadeh Z. Isolation and evaluation their growth kinetic of positive gram bacteria degrader in southern region of the Caspian sea. Environmental Sciences 2008; 5(4): 115-122 (Persian).