

تجزیه هیدروکربن‌های سه حلقه‌ای آنتراسن با استفاده از سودوموناس آئروجینوزا

معصومه ساسانی^۱، دکتر شهرزاد خرم نژادیان*^۲، رضا صفری^۳

۱- دانشجوی رشته آلودگی محیط زیست، گروه محیط زیست، واحد دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی، دماوند، ایران. ۲- استادیار، گروه محیط زیست، واحد دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی، دماوند، ایران. ۳- مربی پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مازندران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات نفتی آروماتیک جزء مهم‌ترین آلاینده‌های آلی بوده که به واسطه عوارض جانبی متعدد نظیر سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سم‌زایی از خطرناک‌ترین ترکیبات نفتی است. در بین باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک، سودوموناس‌ها به واسطه توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده از ابزارهای مهم بیولوژیک در جهت کاهش انواع آلاینده‌ها از جمله هیدروکربن‌های سه حلقه‌ای آنتراسن است. این مطالعه به منظور ارزیابی توانایی سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از مصب رودخانه برای تجزیه آنتراسن در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی نمونه‌ها از رسوبات مصب رودخانه بابلرود اخذ و پس از انتقال به آزمایشگاه در محیط کشت حداقل MSM (Minimal Salt Medium) کشت داده شدند. پس انجام تست‌های بیوشیمیایی و آزمایشات تکمیلی مولکولی، یکی از باکتری‌های جدا شده سودوموناس آئروجینوزا بود. برای ارزیابی تجزیه بیولوژیکی آنتراسن توسط سودوموناس، از عواملی نظیر pH (دامنه ۶/۵ و ۷/۵)، دما (۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غلظت آنتراسن (۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. روند تغییرات آنتراسن و باکتری در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب با استفاده از دستگاه HPLC و قرائت جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید.

یافته‌ها: شرایط بهینه برای تجزیه آنتراسن شامل pH= ۷/۵ دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن بود و با افزایش زمان انکوباسیون، روند تجزیه آنتراسن نیز سریع‌تر صورت گرفت. بازده تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در حضور سودوموناس ۵۰ درصد در طول دو روز بود که نشان‌دهنده توانایی بالای آنزیمی این باکتری است.

نتیجه‌گیری: با توجه به پتانسیل رشد بالای سودوموناس در محیط‌های نامناسب و تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط این باکتری می‌توان از آن به عنوان باکتری شاخص برای حذف آنتراسن استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک، آنتراسن، سودوموناس آئروجینوزا

* نویسنده مسؤل: دکتر شهرزاد خرم نژادیان، پست الکترونیکی khoramnejad@damavandiau.ac.ir

نشانی: دماوند، میدان معلم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند، گروه محیط زیست، تلفن ۰۲۱-۷۶۳۰۱۲۲ و ۰۲۱-۳۳۴۶۲۴۹۹، نامبر ۰۱۱-۳۳۴۶۲۴۹۵-۰۱۱
وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۳/۱۲، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۱۹

مقدمه

در آب یافت می‌شوند که این امر به دلیل پنج برابر بالاتر بودن حلالیت آروماتیک‌ها در مقایسه با آلیفاتیک‌ها است (۳). هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک ترکیباتی سرطان‌زا و موتاژن به‌شمار می‌روند (۲). برخی از روش‌های فیزیکی کاهش آلاینده‌های نفتی مانند شناورسازی فاقد کارآیی بالا بوده و روش‌های معمول شیمیایی مانند استفاده از مواد سورفاکتانت، معمولاً پرهزینه بوده و دارای محدودیت‌های زیادی است. طبق تعریف، پاکسازی زیستی استفاده از موجودات زنده به‌ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به منظور تجزیه آلاینده‌های محیطی و تبدیل آنها به ترکیبات غیرسمی است. میکروارگانیسم‌ها ترکیبات

رود فرآورده‌های ناشی از نفت خام از طریق کشتی‌های حمل‌کننده یکی از عوامل آلاینده دریاها و اقیانوس‌ها است (۱). بخش‌های مختلف نفت خام نیز می‌تواند به طرق متفاوت وارد محیط زیست گردد. سوخت‌های متداول که از مشتقات نفت خام است؛ ترکیبی پیچیده شامل پارافین‌ها، الفین‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک، هیدروکربن‌های آلیفاتیک و مقادیر اندکی از ملکول‌های حاوی سولفور، نیتروژن و اکسیژن است (۲). به‌طور معمول ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام سمی‌تر از ترکیبات آلیفاتیک با همان تعداد اتم کربن است و در غلظت‌های بالاتری نیز

نمونه‌ها با استفاده از ابزار گرب (ابزار نمونه‌برداری از رسوب در مطالعات زیست محیطی) از رسوب رودخانه بابلرود در چندین نقطه از منطقه مصب انجام گرفت. به منظور جلوگیری از مرگ باکتری‌ها در رسوب، نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی ریخته شد و در کوتاه‌ترین زمان و دمای پایین به آزمایشگاه انتقال داده شد.

دستیابی به نمونه خالص باکتری تجزیه کننده آنتراسن: برای جداسازی باکتری موردنظر با استفاده از ویژگی‌های مطلوب به عنوان عامل انتخاب کننده، عموماً از محیط کشت حداقل حاوی ترکیب آلاینده شاخص استفاده شد. برای این منظور، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و تهیه رقت‌های متوالی (لوگ ۲ تا ۵) در سرم فیزیولوژی (۸/۵ در هزار)، کشت در محیط حداقل MSM (Minimal Salt Medium) انجام گردید. ترکیب محیط کشت شامل $(NH_4)_2SO_4$ ۲ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۲ گرم، $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ۰/۰۱ گرم، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۰۱ گرم، $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ ۰/۰۱ گرم و KH_2PO_4 ۱/۵ گرم بود.

پس از تنظیم pH محیط کشت MSM در محدوده ۷، فرایند استریل در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و پس از رساندن دمای محیط کشت به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، آنتراسن (سیگما-آلدریج) استریل شده با صافی میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون (مرک - آلمان) به عنوان تنها منبع کربن به مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد. پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رشد باکتری‌های کشت داده (ظاهر شدن کدورت)، متعاقباً کشت در محیط MSM آگاردار دارای آنتراسن انجام گردید و نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از رشد کلنی‌های تجزیه کننده آنتراسن، نسبت به کشت مجدد و خالص‌سازی کلنی‌های شاخص اقدام گردید (۷۶). رنگ کلنی‌های مشکوک به باکتری‌های تجزیه کننده آنتراسن، زرد کمرنگ بوده و اندازه کلنی‌ها نیز متوسط تا درشت بود و تمامی کلنی‌ها نیز دارای حاشیه صاف و دارای قوام بوده و به راحتی از محیط کنده شدند. بدین صورت که ابتدا به صورت تصادفی از کلنی‌های رشد یافته نمونه گرفته شد و برای جداسازی و خالص‌سازی اولیه سودوموناس‌ها خصوصاً گونه آئروجینوزا از محیط ستریمید آگار استفاده گردید. انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام گردید.

برای شناسایی مولکولی باکتری جدا شده، از واکنش زنجیره پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) استفاده شد (۸). پرایمرهای Forward و Reverse استفاده شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول یک آمده است (۹). استخراج DNA باکتری طبق روش سمایی و همکاران (۸) انجام شد و واکنش زنجیره پلیمراز طی ۳۰ سیکل تکرار گردید.

هیدروکربنی را به دی‌اکسید کربن، بیومس و یا محصولات دیگر تبدیل می‌کنند. البته کارایی و سرعت فرایند تجزیه هیدروکربن‌ها به نوع ترکیبات آلاینده، طبیعت ماده آلوده شده با ترکیبات نفتی، شرایط محیطی و ویژگی‌های جمعیت میکروبی بستگی دارد (۲).

فرایند تجزیه در ترکیبات دارای حلقه‌های بنزنی به سختی صورت گرفته و فقط باکتری‌های دارای آنزیم‌های شاخص قادر به انجام این فرایند هستند. آنتراسن از جمله ترکیبات سه حلقه آروماتیک است که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. آنتراسن منبع اصلی و پایه رنگ‌های آنتراکینون و آلزارین است (۴).

ماده آنتراسن از تقطیر زغال سنگ و احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی حاصل شده و در هوای مناطق شهری و صنعتی به فراوانی یافت می‌شود. وجود آنتراسن در پساب‌های صنعتی کارخانه‌های تولید و یا مصرف کننده آنتراسن باعث افزایش BOD و COD (Chemical Oxygen Demand) (Biochemical Oxygen Demand) می‌گردد و تصفیه بیولوژیکی یکی از راه‌حل‌های مناسب برای این مشکل است. کارایی میکروارگانیسم‌ها به عوامل گوناگونی همچون دما، pH، زمان ماند، میزان شوری محیط، غلظت مواد مغذی، نوع میکروارگانیسم و شرایط محیطی که میکروارگانیسم‌ها قبلاً در آن قرار داشتند بستگی دارد (۲). تعیین شرایط بهینه رشد میکروارگانیسم‌ها برای به حداکثر رساندن تجزیه بیولوژیکی ترکیبات نفتی می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد. مطالعات مختلفی در خصوص اثر متغیرهای زیست‌محیطی نظیر pH، دما، میزان دسترسی میکروب به ترکیب آلاینده، زمان، فون و فلور سایر موجودات بر روند تجزیه ترکیبات آلاینده صورت گرفته و نتایج حاکی از آن است که باکتری‌های مختلف دارای رفتارهای متفاوت بوده و هر یک نیاز به داشتن اپتیمم شرایط برای تجزیه بهینه ماده آلاینده هستند (۳).

این مطالعه به منظور ارزیابی توانایی سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از مصب رودخانه بابلرود برای تجزیه آنتراسن با استفاده دستگاه GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry) در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد.

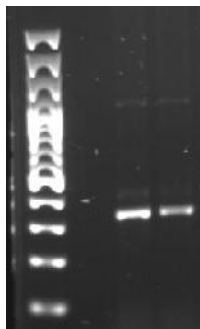
روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی کلیه آزمایشات براساس روش بیان شده در کتاب روش‌های استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب (۵) انجام شد. کلیه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد. **نمونه برداری:** از رسوبات بستر مصب رودخانه بابلرود استان مازندران واقع در استان مازندران در تابستان ۱۳۹۳ نمونه برداری شد و به عنوان محیط جداسازی باکتری استفاده گردید. نمونه برداری در طول سه ماه و به صورت تصادفی انجام شد و پس از تهیه نمونه واحد، برای جداسازی سودوموناس مورد استفاده قرار گرفت.

استفاده قرار گرفتند. کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد (۱۱).
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-18 و آزمون‌های آنالیز واریانس دوطرفه و دانکن در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

باکتری جدا شده: تست‌های اولیه بیوشیمیایی نشان داد که باکتری جدا شده باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت، اکسیداتیو و غیر تخمیری است که با انجام آزمایشات سکانس کردن، سودوموناس آئروجینوزا تأیید شد. نتایج ژل الکتروفورز انجام شده در شکل یک آمده است.



شکل ۱: نتایج ژل الکتروفورز نمونه‌های باکتری به همراه مارکر Ladder ستون ۱: مارکر Ladder، ستون ۲: بلانک یا شاهد ستون‌های ۳ و ۴: نمونه مجهول باکتری

اثر غلظت اولیه آنتراسن بر راندمان حذف: افزایش غلظت آنتراسن باعث کاهش روند رو به رشد سودوموناس آئروجینوزا شد. جدول ۲: لگاریتم تعداد باکتری سودوموناس آئروجینوزا در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن

غلظت آنتراسن		زمان (ساعت)
۲۰۰ (mg/L)	۱۵۰ (mg/L)	
۷/۰۰±۰/۲aC	۷/۰۲±۰/۳۳aC	صفر
۸/۲۵±۰/۰۳bB	۸/۴۸±۰/۰۳aB	۲۴
۸/۴۱±۰/۰۷bA	۹/۲۵±۰/۰۷aA	۴۸

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

جدول ۳: باقی‌مانده غلظت‌های آنتراسن در حضور باکتری سودوموناس آئروجینوزا

باقی‌مانده غلظت آنتراسن		زمان (ساعت)
۲۰۰ (mg/L)	۱۵۰ (mg/L)	
۲۰±۴/۲۵A	۱۵±۱/۴۵A	صفر
۱۶۵±۴/۸۹B	۱۲±۳/۲۶B	۲۴
۱۵۰±۲/۳۰C	۷۳±۴/۱۱C	۴۸

حروف بزرگ متفاوت در ستون حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

میزان کاهش آنتراسن در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بسیار بطئی بود. تغییرات مشاهده شده در

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR

پرایمر	توالی
Forward primers	5'-CCAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
Reverse primers	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) محصول PCR: 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 ارسال گردید. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی به روش سانگر و تطبیق (BLAST) (Basic Local Alignment Search Tool) در ژن بانک NCBI (National Center for Biotechnology Information)، باکتری مجهول شناسایی شد (۸).

آماده‌سازی باکتری برای تلقیح به محیط مایع به منظور ارزیابی روند تجزیه: برای آماده‌سازی تلقیح باکتریایی، ابتدا کشت اولیه باکتری در محیط کشت (Tryptic Soy broth) TSB انجام شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و پس از دور ریختن مایع رویی به رسوب باقیمانده ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و مجدداً سانتریفوژ انجام شد و این فرایند سه مرتبه تکرار گردید. در مرحله آخر به رسوب باقی‌مانده ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، کدورت سوپانسیون با کدورت لوله‌های استاندارد مک فارلند (۰/۵ مک فارلند معادل $10^8 \times 1/5$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) مقایسه شد (۶).

تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در محیط مایع: آزمایش تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM برآث حاوی آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن انجام گردید. پارامترهای مورد نظر شامل غلظت آنتراسن (۱۵۰، ۲۰۰)، زمان انکوباسیون (صفر، ۲۴، ۴۸ ساعت)، pH (۶/۵ و ۷/۵) و دما (۲۵ و ۳۵ سانتی‌گراد) بود و با استفاده از متغیرهای مذکور روش مورد استفاده بهینه‌سازی شد. نمونه‌ها در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد و برای ارزیابی روند رشد باکتری از محیط کشت تریپتیک سوی آگار استفاده گردید. تعداد کلنی‌ها با احتساب رقت مورد استفاده تعیین گردید. برای ارزیابی غلظت باقی‌مانده آنتراسن پس از تجزیه توسط باکتری از دستگاه High-performance liquid chromatography (HPLC، آلمان KNAUER) استفاده شد (۱۰). حلال‌های استونیتریل و آب به نسبت ۹۰ به ۱۰ به عنوان فاز متحرک با شدت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه، ستون C18 و دتکتور UV مورد

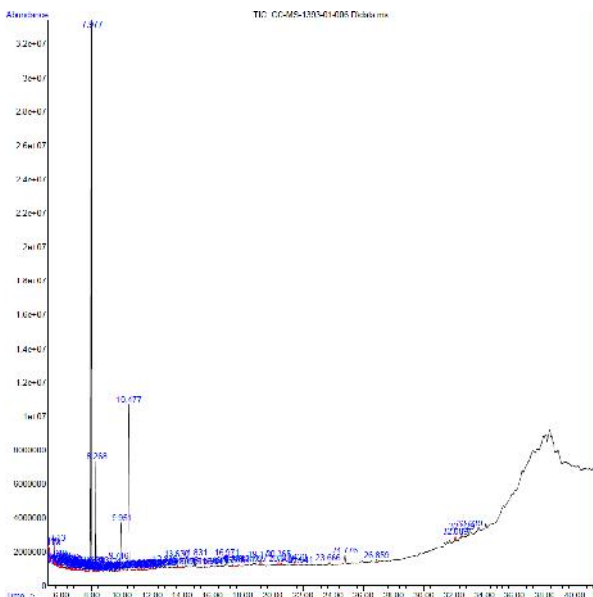
جدول ۷: باقی‌مانده غلظت آنتراسن (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در حضور باکتری سودوموناس آئروجینوزا در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و $pH=7/5$

زمان (ساعت)	دما (درجه سانتی‌گراد)	
	۲۵	۳۵
صفر	$aA 150 \pm 1/45$	$aA 150 \pm 1/34$
۲۴	$aB 120 \pm 2/12$	$bB 122 \pm 3/20$
۴۸	$aC 71 \pm 3/25$	$aC 75 \pm 1/14$

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

راندمان حذف در شرایط بهینه: بهترین شرایط برای تجزیه آنتراسن $pH=7/5$ ، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنتراسن ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتراسن تعیین شد. در چنین شرایطی، راندمان حذف بیش از ۵۰ درصد بود.

شناسایی متابولیت‌های ثانویه ناشی از تجزیه آنتراسن: در شکل ۲ شناسایی متابولیت‌های مختلف که به دنبال تجزیه بیولوژیک آنتراسن تولید شدند؛ نشان داده شده است. بیشترین پیک متابولیت‌های حاصله مربوط به ۲ و ۳ دی هیدروکسی نفتالن بود و پس از آن پیک‌های کاتکول و فتالات مشاهده شد. متابولیت‌های مذکور، جزء مواد حدواسط انتهایی بودند که نشان‌دهنده تجزیه نسبتاً کامل آنتراسن توسط باسیلوس جدا شده است. در شکل ذیل متابولیت‌های بسیار متنوعی تولید می‌شوند که مقادیر آنها بسیار پایین بوده و سریعاً تحت تاثیر تجزیه میکروبی قرار گرفته و به متابولیت بعدی تبدیل می‌شوند. از مهم‌ترین آنها می‌توان به آنتراسن سیس ۱ و ۲ دی هیدروکسی دی ال، ۱ و ۲ دی هیدروکسی آنتراسن و سیس ۴ و ۲ اوکسوبات اکوئیک اسید اشاره نمود.



شکل ۲: طیف جذبی متابولیت‌های ناشی از تجزیه آنتراسن با استفاده از دستگاه GC-MS

تعداد باکتری‌ها و همچنین غلظت آنتراسن در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار بود ($P < 0/05$). غلظت‌های مورد استفاده در تجزیه آنتراسن در این مرحله در $pH=7/5$ انجام گردید (جدول‌های ۳ و ۴).

اثر pH اولیه بر راندمان حذف آنتراسن: با توجه به این که در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، تجزیه باکتریایی بهتر انجام گردید؛ لذا غلظت بهینه برای آزمایشات بعدی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. نتایج جدول‌های ۴ و ۵ نشان‌دهنده تجزیه بهتر آنتراسن در $pH=7/5$ در مقایسه با $pH=6/5$ است.

جدول ۴: لگاریتم تعداد سودوموناس آئروجینوزا در pH های ۶/۵ و ۷/۵ و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن

زمان (ساعت)	pH	
	۶/۵	۷/۵
صفر	$7/01 \pm 0/12 aC$	$7/04 \pm 0/08 aC$
۲۴	$8/02 \pm 0/03 bB$	$8/68 \pm 0/04 aB$
۴۸	$9/18 \pm 0/07 bA$	$9/52 \pm 0/07 aA$

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

جدول ۵: باقی‌مانده غلظت آنتراسن (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در حضور سودوموناس آئروجینوزا در pH های ۶/۵ و ۷/۵

زمان (ساعت)	pH	
	۶/۵	۷/۵
صفر	$150 \pm 1/11 aA$	$150 \pm 1/21 aA$
۲۴	$121 \pm 4/17 aB$	$119 \pm 3/22 aB$
۴۸	$73 \pm 3/26 aC$	$70 \pm 1/82 aC$

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

اثر دما بر راندمان حذف آنتراسن: بیشترین رشد باکتری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد؛ باین وجود تجزیه آنتراسن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون اندکی بهتر صورت گرفت (جدول‌های ۶ و ۷).

جدول ۶: لگاریتم تعداد سودوموناس آئروجینوزا در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در $pH=7/5$ و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن

زمان (ساعت)	دما (درجه سانتی‌گراد)	
	۲۵	۳۵
صفر	$aC 7/00 \pm 0/09$	$aC 7/98 \pm 0/07$
۲۴	$bB 8/50 \pm 0/06$	$aB 8/73 \pm 0/09$
۴۸	$bA 9/35 \pm 0/20$	$aA 9/85 \pm 0/28$

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف حاکی از اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین داده‌ها است.

تغییرات مشاهده شده در تعداد باکتری و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن در هر دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار بود ($P < 0/05$)؛ ولی اختلاف معنی‌داری بین دو دما از نظر تجزیه آنتراسن یافت نشد.

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر با استفاده از سودوموناس آئروجینوزا برای تجزیه آنتراسن در pH=7/5، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر از آنتراسن، راندمان حذف بیش از ۵۰ درصد تعیین شد.

در مطالعه Jacques و همکاران یکی از باکتری‌های شاخص که از خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های حلقوی و نفت خام جدا شد؛ گونه‌های مختلف سودوموناس بود که قادر به تجزیه غلظت‌های بالای نفتالن بودند (۱۲). در مطالعه Simarro و همکاران گونه سودوموناس قادر به تجزیه آنتراسن و نفتالن در غلظت‌های متفاوت بود (۱۳). در مطالعه Prakash و همکاران جنس‌های سودوموناس، باسیلوس و میکروکوکوس از جنس‌های غالب جدا شده از مناطق آلوده به مواد نفتی بودند که قادر به تجزیه بنزن، تولوئن، آنتراسن، نفتالن و گازوئیل بوده و به صورت مصرف ترکیبی بیشترین کاهش در غلظت ترکیب نفتی را نشان دادند (۱۱).

با افزایش غلظت آنتراسن روند تجزیه نیز کندتر می‌شود. علت این امر سمیت PAHs در غلظت‌های بالا برای باکتری‌ها است (۱۴). توانایی تجزیه باکتری در تجزیه ترکیب نفتی به جنس و گونه باکتری، توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه (متفاوت در گونه‌های مختلف یک جنس از باکتری) و زمان انکوباسیون بستگی دارد (۱۲). در مطالعه حاضر زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت بود که زمان نسبتاً کمی برای تجزیه باکتریایی است و باکتری نیاز بیشتری برای آداپتاسیون با شرایط حاضر و در نتیجه تجزیه بیشتر ترکیب نفتی دارد. سودوموناس آئروجینوزا جدا شده در مطالعه حاضر قادر به تجزیه آنتراسن در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر در طول ۴۸ ساعت بود و تا بیش از ۵۰ درصد آن را کاهش داد. در صورتی که در مطالعه دیگران در زمان ۶ تا ۱۰ روز، راندمان تجزیه بین ۵۵ تا ۶۵ درصد تعیین شد (۱۳ و ۱۵). انتظار بر این است که با افزایش زمان انکوباسیون، روند تجزیه آنتراسن توسط سودوموناس‌ها ارتقاء خواهد یافت.

در مطالعه Simarro و همکاران گونه سودوموناس قادر به تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در pH=7 و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بودند (۱۳). در مطالعه Jacques و همکاران سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از خاک آلوده قادر به تجزیه آنتراسن در pHهای ۶/۵، ۷ و ۷/۵ با درصد‌های ۲/۲۸، ۵/۳۲، ۵/۳۴ طی ۵ روز بود که نشان‌دهنده راندمان بالای تجزیه در pH=7/5 است (۱۲) و این یافته با مطالعه حاضر مغایرت دارد. راندمان تجزیه در مطالعه حاضر بیش از ۵۰ درصد بود که طی ۴۸ ساعت رخ داد. اکثر باکتری‌های زیست محیطی دارای فعالیت اپتیمیم در pH=7/5 بوده و در pH های پائین تر و یا بالاتر نیز قادر به رشد و تکثیر هستند. میزان تجزیه آنتراسن به عوامل مختلف از جمله جنس، گونه و حتی سویه

باکتری، فون زیستی، راه متابولیکی برای تجزیه، شرایط محیطی از جمله دما، pH و نیز میزان قابل در دسترس بودن ترکیب آلاینده بستگی دارد.

در مطالعه Jacques و همکاران باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از خاک آلوده قادر به تجزیه آنتراسن در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد در یک دوره ۴ روزه بود که نشان‌دهنده راندمان بالای تجزیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه است (۱۲). در مطالعه حاضر بیشترین راندمان تجزیه آنتراسن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد. مطالعه Obayori و همکاران (۱۶) نشان داد گونه‌های مختلف سودوموناس قادر به تجزیه نفتالن و آنتراسن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بوده و از آن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌گردد. باکتری‌های مختلف بسته به ماهیت گرمادوست، سرمادوست و مزوفیل بودن قادر به رشد و تکثیر در دماهای مختلف بوده و دارای دماهای

مینیمم، ماکزیمم و اپتیمیم برای رشد هستند (۱۳). مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققین نیز تایید کننده نتایج مطالعه حاضر است و در اکثر موارد pH=7/5 و دمای ۳۵ درجه بهترین شرایط را برای رشد باکتری‌های تجزیه کننده فراهم کرده است. به طوری که برخی از گونه‌های باکتریایی در چنین شرایطی، قادر به سازگاری خود با غلظت‌های بالاتر ترکیب نفتی بوده و در نهایت آنرا تجزیه می‌نمایند (۱۲ و ۱۶). زمان انکوباسیون مورد نظر در سایر مطالعات بین ۶ تا ۱۰ روز و یا حتی بیشتر بود؛ در صورتی که در مطالعه حاضر ۲ روز بود و با این وجود، راندمان حذف آنتراسن در مدت روز بیشتر از ۵۰ درصد بود که نشان‌دهنده توانایی بسیار بالای باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده است. نتایج مطالعه یوسفی و همکاران در خصوص ارزیابی روند تجزیه آنتراسن توسط باکتری‌های جدا شده از رودخانه تجن نشان داد که بهترین شرایط تجزیه آنتراسن در pH=7، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن و لوگ ۷ باکتری است. تغییرات تجزیه آنتراسن در باکتری‌های سودوموناس پوتیدا، آکروموباکتریوم، کلسیلا و انتروکوک به ترتیب ۵۱ درصد، ۴۵ درصد، ۴۳ درصد و ۴۸ درصد تعیین شد (۱۷). نتایج حاکی از بالا بودن قدرت تجزیه کنندگی سودوموناس پوتیدا بود که با مطالعه حاضر همخوانی داشته و گونه آئروجینوزا که در این مطالعه ارزیابی شد؛ قدرتی تجزیه کنندگی معادل ۵۰ درصد نشان داد.

Abou-Arab و همکاران موفق به تجزیه بیولوژیکی نفتالن شده و متابولیت‌های ثانویه تولید شده دی‌فیل متان، هیدروکسیستولون، آلفاکادینول، سیکلو هگزان، اسید رتینونیک را گزارش کردند (۱۰) که با نتایج این مطالعه تا حدودی مطابقت دارد. در مطالعه Cemiglia متابولیت‌های مختلف ناشی از تجزیه بیولوژیک ترکیبات آروماتیک حلقوی از نظر کمی و کیفی ارزیابی گردید (۱۸). وجود

مازندران، برای پاکسازی لکه‌های نفتی در مناطق آلوده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم معصومه ساسانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته آلودگی محیط زیست از دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند بود. بدین وسیله از حمایت‌های مدیریت آزمایشگاه مرکزی ساری جناب آقای مهندس محمود حیدری و نیز کارشناسان پژوهشکده اکولوژی دریای خزر آقایان مجید ابراهیم‌زاده و علی‌اکبر عرب احمدی که در نمونه‌برداری ما را یاری نمودند؛ صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

1. Lease CW, Benthams RH, Gaskin SE, Juhasz AL. Isolation and identification of pyrene mineralizing Mycobacterium spp. from contaminated and uncontaminated sources. *Appl Environ Soil Sci*. 2011; 46(7): 171-83. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/409643>
2. Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. *Ann Microbiol*. 2005; 55(4): 255-9.
3. Boyle D, Wiesner C, Richardson A. Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998 Jul; 30(7): 873-82. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00219-8)
4. Emtiazjo M, Sedighi S, Emtiazjo M. [Bioremediation of anthracene in siri island with and emphasis on biosfety]. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2009; 11(3): 258-68. [Article in Persian]
5. Water Environment, Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington DC: American Public Health Association. 1998; pp: 123-32.
6. Yaghobzadeh Z, Safari R. [Naphthalene biodegradation by bacteria isolated from the Caspian sea]. *Journal of Marine Sciences and Technology*. 2006; 5(1-2): 89-96. [Article in Persian]
7. Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 1992; 3(2): 351-68. doi: 10.1007/BF00129093
8. Samaei MR, Mortazavi SB, Bakhshi B, Jonidi Jafari A. Isolation, genetic identification, and degradation characteristics of N-hexadecane degrading bacteria from tropical areas in Iran. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2013 Jan; 22(4): 1304-12.
9. Barret M, Carrère H, Delgadillo L, Patureau D. PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge: Do bioavailability and/or cometabolism limit their biodegradation? *Water Res*. 2010 Jul; 44(13): 3797-806. doi: 10.1016/j.watres.2010.04.031

فتالات در هنگام تجزیه نشان‌دهنده آن است که باکتری از طریق راه متابولیسمی فتالات عمل کرده و آنتراسن را به فتالات تبدیل کرده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سودوموناس آنروجینوزا جداشده از رسوبات مصب رودخانه بابلرود، پتانسیل و قدرت تجزیه آنتراسن را دارا بوده و در شرایط اپتیمم از نظر دما و pH قادر به حذف بیش از ۵۰٪ آنتراسن در محیط کشت آزمایشگاهی است. با انجام آزمایشات تکمیلی تجزیه بیولوژیک سایر ترکیبات آروماتیک توسط باکتری سودوموناس آنروجینوزا و دستیابی به نتایج مستدل، می‌توان از این جنس، به جهت بومی بودن در شرایط آب و هوایی

10. Abou-Arab AAK, Abou-Bakr S, 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): 1237-46.
11. Prakash A, Bisht S, Singh J, Teotia P, Kela R, Kumar V. Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. *Turkish J Eng Env Sci*. 2014; 38: 41-50. doi: 10.3906/muh-1306-4
12. Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, Peralba MCR, Selbach PA, Sá ELS, et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2005 Oct; 56(3): 143-50. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.06.005>
13. Simarro R, González N, Bautista LF, Molina MC. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a wood-degrading consortium at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013 Feb; 83(2): 438-49. doi: 10.1111/1574-6941.12006
14. Cripps C, Bumpus JA, Aust SD. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*. 1990 Apr; 56(4): 1114-8.
15. Bisht S, Pandey P, Sood A, Sharma Sh, Bisht NS. Biodegradation of naphthalene and anthracene by chemotactically active rhizobacteria of *Populus deltoides*. *Braz J Microbiol*. 2010; 41(4): 922-30.
16. Obayori OS, Adebuse SA, Adewale AO, Oyetibo GO, Oluyemi OO, et al. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *J Environ Sci (China)*. 2009; 21(2): 243-8.
17. Yousefi Z, Safari R, Sarvi S, Mohammadpour Tahmtan RA, Rostamali E. [Anthracene Biodegradation by Bacteria Isolated from Tajan River Estuary]. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 24 (118) :111-22. [Article in Persian]
18. Cerniglia CE. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol*. 1984; 30: 31-71.

Original Paper

Degradation of polycyclic hydrocarbones anthracene by using *Pseudomonas aeruginosa*

Sasani M (M.Sc)¹, Khoramnejadian Sh (Ph.D)^{*2}, Safari R (B.Sc)³

¹M.Sc Student in Environmental Pollution, Department of Environment, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, Iran. ²Assistant Professor, Department of Environment, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, Iran. ³Academic Instructor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Mazandaran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are the most important organic pollutants that causing multiple side effects including carcinogenic, mutagenic and toxicity. Among the aromatic compounds degrading bacteria, *pseudomonas* produce board spectrum of degrading enzymes and are used, as biological tools, for decreasing of PAHs. This study was done to evaluate the degradation of polycyclic hydrocarbones anthracene by using *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: In this descriptive – analytic study, sampling was collected from river estuary sediment and had cultured in Minimal Salt Medium (MSM). *Pseudomonas aeruginosa* was one of the isolated bacteria from river sediment which identified by molecular technique. In next step, influence of pH (6.5 and 7.5) temperature (25 and 35°C) and concentration of anthracene (150 and 200 ppm) were surveyed on anthracene biodegradation and bacterial growth during zero, 24 and 48 hours by HPLC and spectrophotometry method respectively.

Results: The results showed that the optimized condition for biodegradation included pH=7.5, 35°C and 150 ppm of anthracene. Bacterial degradation of anthracene was increased with prolong of incubation time. Biodegradation efficiency of anthracene in the presence of *pseudomonas* was 50% within 2 days, which indicates the ability of the bacteria for the enzymes production.

Conclusion: High growth potential of *pseudomonas* in unsuitable areas and due to the production of degrading enzymes, it can be used as indicator bacteria used to remove anthracene.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Anthracene, *Pseudomonas aeruginosa*

* Corresponding Author: Khoramnejadian Sh (Ph.D), E-mail: khoramnejad@damavandiau.ac.ir

Received 28 Feb 2016

Revised 1 Jun 2016

Accepted 8 Jun 2016