مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۶۷-۱۵۷

Original Article

# تجزیه زیستی فلورانتن به وسیله باکتری های بومی جدا شده از رسوبات جنگل های حرای خلیج فارس

**فرشید کفیل زاده*[۱]، پروین امیری[۲]، عاطفه رضایی[۲]، نرگس احمدی[۳]**

[۱] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی،
[۳] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، گروه میکروب شناسی

## چکیده

*سابقه و هدف:* هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای گروهی از ترکیبات آلی هستند که دارای دو یا چند حلقه آروماتیک می باشند. تقریباً ۹۰٪ از این ترکیبات سرطان زا هستند. برای حذف این آلودگی ها از محیط زیست روش های مختلفی استفاده می شود اما استفاده از میکروارگانیسم ها برای پاکسازی این آلودگی ها مؤثرتر و ارزان تر می باشد. این پژوهش با هدف جداسازی باکتری های بومی تجزیه کننده فلورانتن از رسوبات جنگل های حرای خلیج فارس انجام شد.

*مواد و روش ها:* این پژوهش به صورت مقطعی بر روی رسوبات جنگل های حرا خلیج فارس انجام شد. تعداد باکتری ها در محیط کشت حاوی فلورانتن و محیط کشت فاقد فلورانتن شمارش گردید. جداسازی باکتری های تجزیه کننده فلورانتن با کشت نمونه ها بر روی محیط پایه معدنی MSM و MSM آگار صورت گرفت. ارزیابی قدرت تجزیه کنندگی باکتری ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. در نهایت شناسایی مولکولی سویه های برتر با استفاده از روش 16S rRNA انجام گرفت.

*یافته ها:* تعداد باکتری های در محیط بدون فلورانتن بالاتر از محیط حاوی فلورانتن گزارش شد. از بین باکتری های جدا شده *باسیلوس سیرکولانس*، *آلکالیژنز فکالیس*، *انتروباکتر*، *لیستریا* و *استافیلوکوکوس* بیشترین توانایی را تجزیه فلورانتن داشتند. اما باکتری *باسیلوس سیرکولانس* و *آلکالیژنز فکالیس* با توانایی تجزیه کنندگی ۷۳/۴٪ و ۷۱٪ بیشترین تجزیه و رشد را در حضور فلورانتن از خود نشان دادند.

*نتیجه گیری:* یافته های این پژوهش نشان داد که رسوبات جنگل های حرای خلیج فارس دارای تعداد زیادی از باکتری های تجزیه کننده فلورانتن می باشند. این مساله ضرورت توجه به باکتری های بومی به منظور زیست پالایی آلاینده ای نفتی را نشان می دهد.

*واژگان کلیدی:* اصلاح زیستی، فلورانتن، *باسیلوس سیرکولانس*، جنگل حرا.

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

## مقدمه

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) گروهی از ترکیبات آلی هستند که دارای دو یا چند حلقه آروماتیک به هم پیوسته از اتم های کربن و هیدروژن می باشند. این ترکیبات از نفتالن با دو حلقه شروع شده و به کرونین با هفت حلقه ختم می گردند (۱). نفت و دیگر سوخت های فسیلی منبع اصلی ورود هیدروکربن های چند حلقه ای آروماتیک به طبیعت محسوب می شوند.

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹ پست الکترونیک: Kafilzadeh@jia.ac.ir

بین ۷ تا ۲۰ درصد وزن نفت خام را هیدروکربن های چند حلقه ای آروماتیک تشکیل می دهند که متعلق به گروه آلاینده های آلی پایدار می باشند (۲). این ترکیبات حلالیت نسبتاً کمی در آب دارند و میل شدیدی به جذب در ذرات معلق و رسوبات دارند و با نور ماورای بنفش خورشید تجزیه می گردند. جابجایی ترکیبات PAH در آب بر اثر ذرات معلق، سیل و فرآیند پالایش صورت می گیرد. در مجموع بیش از ۱۰۰ ترکیب شناسایی شده که ۱۶ ترکیب از آن ها بر اساس گزارش های سازمان بهداشت جهانی از بقیه مهم تر می باشند (۱). هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای باعث ایجاد برخی تأثیرات بیولوژیک می شوند. این تأثیرات شامل سمیت شدید، جهش زایی، نقص جنین، اختلال در فعالیت غدد درون ریز می باشند (۳). علاوه بر این تقریباً ۹۰٪ از ترکیبات PAH سرطان زا هستند. مطالعات آماری نشان می دهند که افرادی که در معرض غلظت بالایی از ترکیبات PAH بوده اند مبتلا به تومور ریه، سرطان پوست، مثانه و احتمال بروز سایر بیماری ها شده اند. سرطان ریه از شایع ترین تومورها در افرادی است که در معرض هوای حاوی ترکیبات PAH از طریق تنفس بوده اند. به علاوه سرطان زایی ترکیبات مختلف PAH با آزمایش روی حیوانات به اثبات رسیده است (۴). تولید تومورهای سرطانی به تغییرات این ترکیبات در بدن بستگی دارد که در اثر صدمه زدن به DNA در سلول ها ایجاد می شود (۵). برای حذف این آلودگی های نفتی از محیط زیست روش های مختلفی مانند سوزاندن، خاکستر کردن، شستشو با سورفکتانت ها و استفاده از مواد شیمیایی وجود دارد. این روش ها یا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشند یا باعث به وجود آمدن ترکیبات سمی دیگری در محیط می شوند (۶). اما استفاده از میکروارگانیسم ها برای پاکسازی آلودگی خاک و آب می تواند مؤثر و ارزان باشد و ایمنی محیطی را با پاکسازی مواد زاید فراهم نماید (۷). اصلاح زیستی بخشی از یک فناوری به شمار می رود که از فرآیندهای میکروبی جهت تبدیل آلاینده های محیط زیست به محصولاتی با سمیت کمتر مانند دی اکسیدکربن، آب و نمک های آلی ساده بهره می برد. این روش برای پاک سازی مواد دفعی مایع و جامد غیرسمی، آب های آلوده، مواد دفعی سمی زیان آور و آلودگی نفتی به کار می رود. آن چه که این فرآیند را به یک فرآیند بسیار مهم در عرصه حفاظت از محیط زیست بدل می نماید، استفاده ازمیکروارگانیسم های بومی منطقه ای جهت حفظ ایمنی زیستی می باشد (۳). میکروارگانیسم ها توسط واکنش های تنفسی هوازی، بی هوازی، تخمیر، کومتابولیسم و دهالوژنه کردن، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را به ترکیبات کم ضررتر تبدیل و از آن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می نمایند (۳). یکی از مهم ترین هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای پراکنده در محیط فلورانتن می باشد که یک PAH چهار حلقه ای است. *مایکوباکتریوم ها* (*Mycobacterium*) از مهم ترین باکتری هایر تجزیه کننده ترکیبات PAH دارای وزن مولکولی بالا مانند فلورانتن، پیرن و بنزوآپیرن می باشند. همچنین باکتری های *بورخولدریا* (*Burkholderia*)، *پاستورلا* (*Pasteurella*)، *رودوکوکوس* (*Rhodococcus*)، *اسفنگوموناس* (*Sphingomonas*) و *استنوتروفوموناس* (*Stenotrophomonas*) به عنوان باکتری های قادر به تجزیه فلورانتن جداسازی شده اند (۸). جنگل های حرا یکی از مناطق مستعد به آلودگی های نفتی می باشند و مانند یک مخزن مقدار زیادی از ترکیبات PAH را از آلودگی های نفتی، فاضلاب و تخلیه های صنعتی دریافت می کنند (۹). در تحقیقی که توسط گو (Guo) و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی رسوبات سطحی چند حرا صورت گرفت باکتری های *اسفنگوموناس*، *رودوکوکوس* و *پاراکوکوس* به عنوان باکتری های توانا در تجزیه فلورانتن جداسازی شدند (۱۰). همچنین تام (Tam) و همکاران در سال ۲۰۰۸ رسوبات سطحی دو گیاه حرا را برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده PAH بررسی نمودند. یافته های آنها نشان داد که باکتری های غنی شده با فلورانتن توانایی تجزیه حدود ۴۰٪ از فلورانتن را دارند (۱۱). تیان (Tian) و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان تجزیه فنانترن، فلورانتن و بنزوآپیرن را توسط باکتری های جدا شده از رسوبات جنگل های حرا در چین اندازه گیری نمودند (۱۲).

هدف از این پژوهش، بررسی توانایی تجزیه زیستی فلورانتن توسط باکتری های بومی جدا شده از رسوبات جنگل های حرای پارک ملی نای بند بود.

## مواد و روش‌ها

*الف) جمع آوری نمونه:* در این پژوهش رسوبات جنگل های حرای جنوب ایران واقع در پارک ملی نای بند به صورت مقطعی مورد بررسی قرار گرفت. این پارک در دو استان بوشهر و هرمزگان واقع شده است و از بخش شمال غربی محدود به تأسیسات سمی عسلویه می باشد. نمونه برداری از عمق ۰ تا ۳ سانتی متری رسوبات سطحی سه ایستگاه مختلف (هر ایستگاه با سه تکرار) در دو فصل پاییز و زمستان صورت گرفت. نمونه های مورد نظر درون ظروف شیشه ای استریل جمع آوری شدند و درون محفظه یخ، در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت برای انجام مرحله غنی سازی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از دستگاه جی پی اس (GPS) برای تعیین موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری استفاده شد.

*ب) شمارش باکتری ها:* پس از جمع آوری نمونه های رسوب از آن ها رقت های $10^{-1}$ تا $10^{-10}$ تهیه گردید. سپس این رقت ها بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر فلورانتن و نوترینت آگار فاقد فلورانتن کشت داده شدند. پلیت های کشت داده شده در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردیدند. پس از مدت زمان ۴۸ ساعت شمارش کلنی ها صورت گرفت (۱۳).

*ج) غنی سازی و جداسازی باکتری های تجزیه کننده فلورانتن:* به منظور غنی سازی میکروبی با فلورانتن، ابتدا ۱۰ میلی لیتر از رسوبات شناور به ظروف حاوی ۹۰ میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی (Mineral Salt Medium = MSM) استریل حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر فلورانتن اضافه گردید و در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد درون انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm گرم خانه گذاری شدند. پس از ۲ هفته و با مشاهده کدورت در محیط کشت ۱۰ میلی لیتر از محیط های مورد نظر جدا و به یک محیط MSM جدید تلقیح گردید (۱۱). عمل تجدید کشت به مدت ۳ هفته با شرایط یادشده ادامه یافت. سپس نمونه های مورد نظر بر روی محیط جامد MSM پوشیده شده با لایه ای از فلورانتن با میزان ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر کشت داده شدند. کلنی های باکتریایی تولید کننده هاله های شفاف به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند (۱۰). پس از خالص سازی این باکتری ها اقدام به شناسایی آن ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم، مطالعه ویژگی های مورفولوژیک، واکنش های کاتالاز و اکسیداز و دیگر تست های تشخیصی گردید (۱۴).

*د) انتخاب سویه های برتر:* پس از جداسازی و شناسایی باکتری های مورد نظر به منظور شناسایی بهترین و قوی ترین سویه های تجزیه کننده فلورانتن، آن ها را در محیط MSM حاوی فلورانتن کشت داده شد. باکتری هایی که در حداقل زمان ممکن در مجاورت ماده آروماتیکی، بیشترین رشد و بیشترین کدورت را داشتند به عنوان سویه های میکروبی پرقدرت در تجزیه فلورانتن انتخاب گردیدند. به این معنا که هر چه محیط کدرتر باشد، میزان رشد باکتری ها نیز بیشتر بوده است. از این رو با مقایسه لوله های حاوی باکتری با استاندارد ۰/۵ مک فارلند، حدود $1/5\times10^{8}$ باکتری به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت پایهٔ معدنی تلقیح شد و پس از ۳ روز کدورت محیط ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید (۱۵).

*ه) ارزیابی رشد باکتری ها در غلظت های مختلف فلورانتن به وسیله جذب نوری:* برای بررسی رشد باکتری ها در غلظت های مختلف فلورانتن ابتدا برای هر کدام از باکتری های جدا شده ۴ ارلن که هر کدام حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MSM بود در نظر گرفته شد. به هر کدام از ارلن ها یکی از غلظت های ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر از فلورانتن اضافه گردید. سپس ۵ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی به هر کدام از ارلن های حاوی محیط MSM اضافه شد. علاوه بر ظروف آزمایش از یک ظرف کنترل که فاقد فلورانتن بود نیز استفاده گردید و پس از گرمخانه گذاری آن ها به مدت زمان ۱ هفته در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد درون انکوباتور شیکردار، هر روز به فاصله زمانی ۱۲ ساعت بار

اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۱۶).

*و) ارزیابی تجزیه فلورانتن توسط باکتری ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)*: برای بررسی میزان توانایی باکتری های جدا شده در تجزیه زیستی فلورانتن ابتدا به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط پایه معدنی مقدار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر فلورانتن اضافه گردید. سپس از هر کدام از باکتری های جدا شده سوسپانسیون باکتریایی بر اساس ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و به محیط های پایه آماده شده اضافه گردید و به مدت ۱۰ روز درون انکوباتور شیکردار در دمای ۲۲ درجه گرمخانه گذاری صورت گرفت. پس از این زمان ۲ میلی لیتر هگزان به ۵ میلی لیتر محیط معدنی مورد نظر منتقل و به مدت ده دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس یک میلی لیتر از فاز بالایی (هگزان) به لوله های استریل منتقل گردید و توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی با (High performance liquid chromatography= HPLC) مدل Waters 600E (USA) میزان تجزیه فلورانتن توسط باکتری های جدا شده خوانده شد (۱۷).

*ز) استخراج DNA*: استخراج DNA با استفاده کیت مخصوص استخراج DNA ژنوم باکتریایی (Fermentase K0512) مربوط به شرکت Fermentase انجام گردید.

*ح) واکنش زنجیره پلیمراز و تعیین توالی ژن 16S rRNA*: پس از اندازه گیری و سنجش قدرت باکتری های جدا شده در تجزیه فلورانتن دو باکتری قوی تر برای انجام PCR انتخاب شدند. در این مطالعه به منظور تکثیر توالی ژن 16S rRNA از پرایمرهای F-5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و R-5'- ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت، که شامل ۳۶/۶ میکرولیتر آب دی یونیزه، ۴ میکرولیتر نمونه DNA، ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر، ۸/۲ مخلوط واکنش PCR حاوی آنزیم Taq DNA polymerase (0.025 U/µl)، dNTPs (۰/۲ میلی مول بر لیتر)، $MgCl_2$ (۱/۵ میلی مول بر لیتر)، $(NH_4)_2SO_4$ (۲۰ میلی مول بر لیتر)، Triss_HCl (۷۵ میلی مول بر لیتر) و ۲۰ Tween (۰/۱٪) می باشد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Corbet، استرالیا) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. به منظور مشاهده الگوی باندی محصول PCR، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۷۰ (w/v) به مدت ۱ ساعت انجام شد. محصول PCR تکثیر ژن 16S rRNA جهت تعیین توالی از طریق شرکت ژن فن‌آوران به شرکت Ampliqon (کره جنوبی) ارسال گردید. با آنالیز BLASTn توالی حاصل در پایگاه Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genebank)، سویه‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۸).

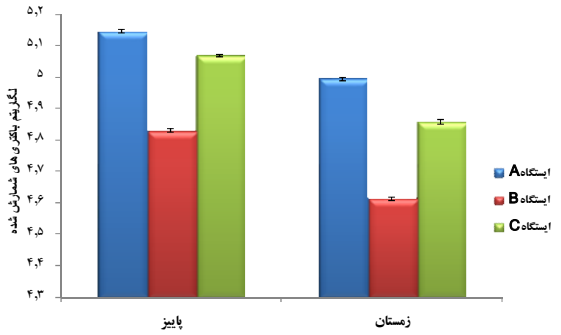
*ط) آنالیز آماری*: برای مقایسه ایستگاه ها و فصل ها از نظر تفاوت میانگین تعداد باکتری های تجزیه کننده فلورانتن در نمونه های رسوب از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و دانکن (Duncan) استفاده شد. سطح خطای مورد نظر ۱٪ می باشد ($p< ۰/۰۱$).

## یافته ها

در این پژوهش از بین باکتری های جدا شده از رسوبات جنگل های حرا در خلیج فارس ۵ باکتری غالب دارای قدرت تجزیه کنندگی بیشتر نسبت به سایر باکتری ها شناسایی شدند. این باکتری ها شامل *باسیلوس سیرکولانس*، *آلکالیژنز فکالیس*، *انترو باکتر*، *لیستریا* و *استافیلوکوکوس* بودند. نتایج شمارش باکتری ها نشان می داد که بین ایستگاه‌ها از نظر باکتری‌های شمارش شده تفاوت وجود دارد. بیشترین شمارش باکتری در ایستگاه A با میزان ۵/۰۶۹ cfu/g یافت شد. کمترین شمارش مربوط به ایستگاه B با میزان ۴/۷۲۱ cfu/g بود. تمامی ایستگاه‌ها با یکدیگر تفاوت معناداری را در سطح یک درصد

نشان دادند (نمودار ۱). هم چنین بیشترین تعداد باکتری در محیط کنترل که فاقد فلورانتن بود با میزان cfu/g ۵/۰۶۲ و کم ترین تعداد باکتری در محیط حاوی فلورانتن با میزان cfu/g ۴/۷۷۵ مشاهده شد. بین این دو گروه تفاوت معنی داری در سطح یک درصد مشاهده گردید. همچنین در مقایسه دو فصل پاییز و زمستان از نظر میانگین باکتری شمارش شده، بیشترین تعداد باکتری در فصل پاییز با میزان cfu/g ۵/۰۱۸ و کمترین تعداد در فصل زمستان با میزان cfu/g ۴/۸۲۶ شمارش شد و بین این دو فصل تفاوت معنی داری در سطح یک درصد مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین باکتری های تجزیه کننده مربوط به *آلکالیژنز فکالیس* و *باسیلوس سیرکولانس* به ترتیب با فراوانی ۳۰/۸۹ و ۳۵/۳ می باشد. نتایج کدورت سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر، در محیط های کشت حاوی باکتری های یاد شده، پس از سه روز تلقیح نشان داد که بیشترین میزان جذب نوری مربوط به محیط های کشت حاوی باکتری های *آلکالیژنز فکالیس* و *باسیلوس سیرکولانس* می باشد. این دو باکتری نسبت به سایر باکتری های جداسازی شده، رشد و کدورت بسیار بالایی در محیط کشت مایع حاوی فلورانتن داشتند و رنگ محیط کشت را کدر کردند (جدول ۱).

نتایج بررسی نمودار رشد باکتر ی های جدا شده در مدت ۷ روز نشان داد که دو باکتری *آلکالیژنز فکالیس* و *باسیلوس سیرکولانس* بهترین رشد را در حضور غلظت ۰/۰۵ گرم بر لیتر




نمودار ۱: باکتری‌های شمارش شده در سه ایستگاه به تفکیک فصول مختلف

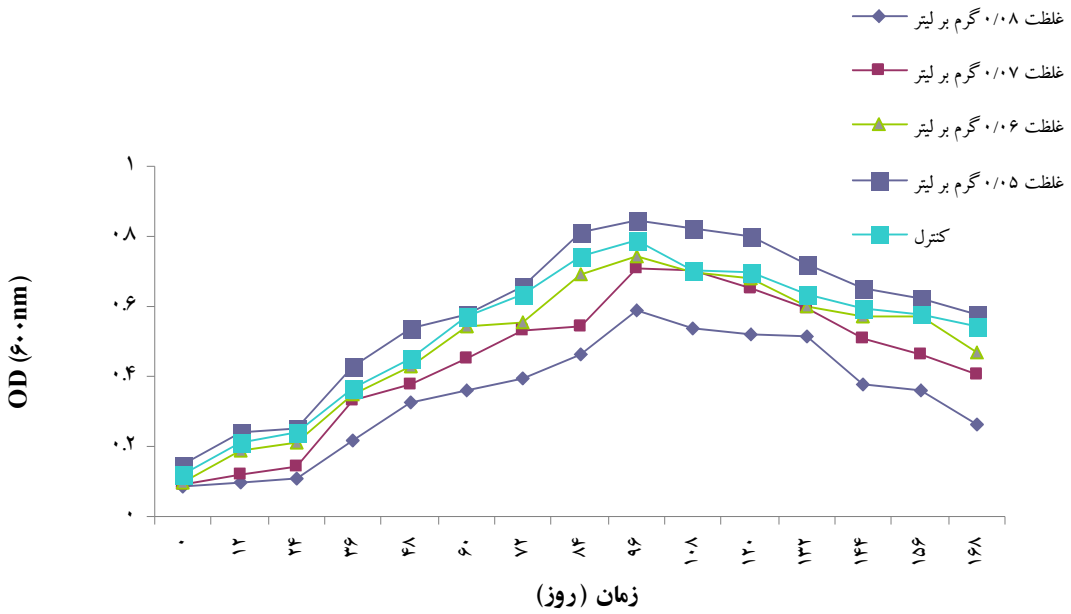
فلورانتن دارند. اما در حضور غلظت های بالاتر این ماده رشد باکتری ها کاهش داشت. *باسیلوس سیرکولانس* بالاترین دانسیته نوری درطول موج ۶۰۰ nm با ارزش ۰/۸۴۳ پس از ۹۶ ساعت (نمودار ۲) و سپس *آلکالیژنز فکالیس* با دانسیته نوری ۰/۷۲۸ پس از ۹۶ ساعت از شروع کشت (نمودار ۳) بالاترین رشد را نشان دادند. بااستفاده از نتایج به دست آمده از بررسی سینتیک رشد، این دو باکتری به عنوان قوی ترین سویه های جدا شده شناخته شدند. نتایج HPLC نشان داد که قوی ترین سویه های تجزیه کننده فلورانتن باکتری های *باسیلوس سیرکولانس* و *آلکالیژنزفکالیس* به ترتیب با توانایی تجزیه کنندگی ۷۳/۴٪ و ۷۱٪ می باشند. همچنین باکتری های *انتروباکتر*، *لیستریا* و *استافیلوکوکوس* به ترتیب توانستند ۶۷/۴٪ ، ۵۴٪ و ۴۸/۷٪ از فلورانتن را تجزیه نمایند.

در نهایت نتایج تعیین توالی ژن 16Sr RNA دو سویه برتر

جدول ۱: زمان و میزان تقریبی رشد باکتری های تجزیه کننده فلورانتن در محیط پایه معدنی

| نام باکتری | زمان (ساعت) ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ | رنگ محیط پس از ۹۶ ساعت | جذب نوری (۶۰۰ نانومتر) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **شاهد** | | | | | زرد شفاف | ۰ |
| ***باسیلوس سیرکولانس*** | | + | ++ | +++ | کدر | ۰/۸۶ |
| ***انتروباکتر*** | + | + | ++ | ++ | کدر | ۰/۷۱ |
| ***آلکالیژنز فکالیس*** | + | ++ | ++ | +++ | کدر | ۰/۷۴ |
| ***استافیلوکوکوس*** | − | + | + | + | کدر | ۰/۶۱ |
| ***لیستریا*** | − | + | + | + | کدر | ۰/۵۸ |

+: رشد ضعیف ++ : رشد متوسط +++ : رشد زیاد

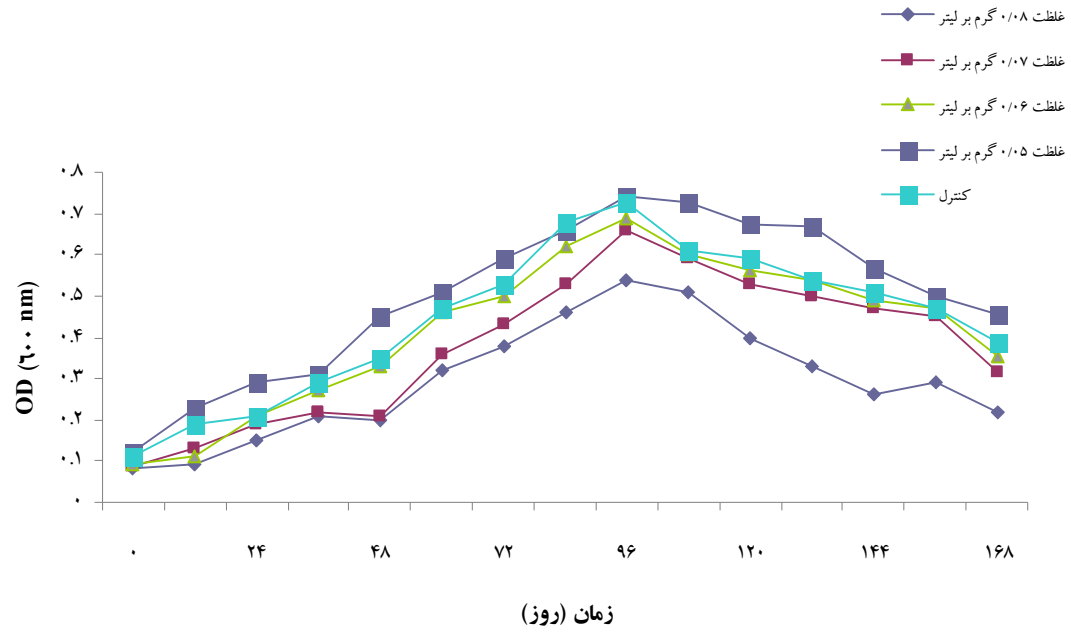



نمودار۲: منحنی رشد *باسیلوس سیرکولانس* در حضور غلظت های مختلف فلورانتن

دارای بیشترین توانایی تجزیه فلورانتن نشان داد که متعلق به سویه های *Alcaligenes faecalis* و *Bacillus circulans* می باشند. سپس هر دو سویه در بانک ژنی NCBI با شماره های دسترسی JX486706 و JX486705 به ترتیب ثبت گردیدند.

## بحث

در مطالعه حاضر نتایج مربوط به شمارش باکتری ها نشان می دهد که بیشترین شمارش باکتری های تجزیه کننده فلورانتن مربوط به فصل پاییز می باشد که به دلیل نزدیک تر بودن دمای این فصل به دمای بهینه رشد باکتری های مزوفیل و




نمودار۳: منحنی رشد *آلکالیژنزفکالیس* در حضور غلظت های مختلف فلورانتن

ترموفیل جدا شده از رسوبات جنگل های حرای خلیج فارس می باشد. در این تحقیق ۵ باکتری بومی تجزیه کننده فلورانتن از رسوبات جنگل های حرای خلیج فارس جداسازی شدند که شامل باکتری های *باسیلوس سیرکولانس*، *آلکالیژنز فکالیس*، *انترو باکتر*، *لیستریا* و *استافیلوکوکوس* می باشند. این باکتری ها پراکندگی وسیعی در رسوبات جنگل های حرا داشتند و همچنین توانایی بالایی را در تجزیه فلورانتن از خود نشان دادند. از بین باکتری های جدا شده در این تحقیق غالب ترین باکتری که قدرت تجزیه کنندگی خوبی را نشان داد باکتری *باسیلوس سیرکولانس* می باشد.

به طور کلی باکتری *باسیلوس* به دلیل داشتن آنزیم های متعدد توانایی بالایی در تجزیه ترکیبات PAH از خود نشان می دهد. توان تجزیه کنندگی *باسیلوس* در نتایج تحقیقات محققانی مانند ذوالفقاری (Zolfaghari) در سال ۲۰۰۶، ابوسعود (Abou seoud) در سال ۲۰۰۳ و ایتکن (Aitken) و همکاران در سال ۱۹۹۸ ذکر گردیده است که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۱۹).

همچنین در پژوهش هایی که توسط محققین دیگر صورت گرفته باکتری های متنوعی به عنوان باکتری های توانا در تجزیه ترکیبات PAH جداسازی شده اند که بعضی از آن ها مشابه با باکتری های جدا شده در پژوهش جاری می باشند. از جمله ژانگ (Zhuang) و همکاران در سال ۲۰۰۳ سه باکتری گرم مثبت تجزیه کننده فنانترن از جنس های *باسیلوس*، *استافیلوکوکوس* و *میکروکوکوس* را از رسوبات مناطق جزر و مدی گرمسیری آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی کردند (۲۰).

ردا (Reda) در سال ۲۰۰۹ خاک های آلوده به نفت را مورد بررسی قرارداد که باکتری های تجزیه کننده جدا سازی شده شامل باکتری های *میکروکوکوس*، *باسیلوس*، *سودوموناس* و *بورخولدریا* بودند (۷). ایدوک (Eduok) و همکاران در سال ۲۰۱۰ جنگل حرا در نیجریه را مورد بررسی قرار دادند و باکتری های تجزیه کننده PAH را جدا سازی و شناسایی کردند که باکتری های جداسازی شده شامل *سیتروباکتر*، *استافیلوکوکوس*، *باسیلوس*، *انتروباکتر*، *اسینتوباکتر* و *لیستریا* بودند. برخی باکتری های جدا شده توسط ایدوک در تحقیق حاضر نیز جداسازی شدند (۲۱). کفیل زاده (Kafilzade) و همکاران در سال ۲۰۱۱ خاک های آلوده به نفت در ایران را بررسی نموده و باکتری های *استافیلوکوکوس*، *کورینه باکتریوم*، *سودوناس*، *باسیلوس* و *میکروکوکوس* را جداسازی نمودند که این باکتری ها توانایی تجزیه نفتالین را دارا بودند (۲۲).

لورس (Lors) و همکاران در سال ۲۰۱۲ خاک های آلوده شده به ترکیبات PAH بررسی نمودند و ۱۳ سویه باکتری متعلق به ۹ جنس را جداسازی کردند که شامل *سودوموناس*، *اسینتوباکتر*، *انتروباکتر*، *کلبسیلا*، *آلکالیژنز* و *اریترومیکروبیوم* بودند. دو باکتری *انتروباکتر* و *آلکالیژنز* در تحقیق جاری نیز جداسازی شدند (۲۳). سروری (Survery) و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی خاک نزدیک به چند پمپ بنزین در شهر کراچی تحقیقی انجام دادند که موفق به جداسازی و شناسایی ۶۰ سویه باکتری شدند که متعلق به جنس های *استافیلوکوکوس*، *کورینه باکتریوم*، *باسیلوس*، *پروتئوس*، *سودوموناس*، *اشریشیا* و *کلبسیلا* بودند که این باکتری ها توانایی حذف هیدروکربن های مورد آزمایش را داشتند (۲۴). در تحقیق دیگری که توسط اربابی (Arbabi) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد عملیات تجزیه فنانترن از دو مکان آلوده به نفت خام در ایران بررسی گردید. در این تحقیق باکتری های *سراشیا*، *میکروکوکوس*، *باسیلوس* و *سودوموناس* جداسازی شدند (۲۵).

همچنین امتیازجو (Emtyazjoo) و همکاران در سال ۲۰۱۰ رسوبات حوزه نفتی سیری واقع در خلیج فارس را مورد بررسی و میکروارگانیسم های تجزیه کننده آنتراسن *باسیلوس*، *سودوموناس* و *استافیلوکوکوس* را جداسازی کردند (۱۹).

به طور کلی با توجه به اینکه جنگل های حرا در مجاورت فعالیت های انسانی قرار دارند، مستعد به آلودگی های متنوعی مانند ترکیبات PAH از منابع انسانی می باشند. میکروارگانیسم های موجود در رسوبات آلوده جنگل-های حرا به دلیل سازگار شدن می توانند قابلیت و توانایی بالایی را در تجزیه ترکیبات PAH داشته باشند (۲۶). نتایج HPLC در پژوهش حاضر نیز نشان دهنده قدرت بالای باکتری های جدا شده در تجزیه

فلورانتن می باشد. باکتری های *باسیلوس سیرکولانس* و *آلکالیژنز فکالیس* به ترتیب توانستند ۷۳/۴٪ و ۷۱٪ از فلورانتن را تجزیه نمایند. این نتایج نشان می دهد باکتری های *باسیلوس سیرکولانس* و *آلکالیژنزفکالیس* قوی ترین باکتری های تجزیه کننده فلورانتن از بین باکتری های جدا شده می باشند. تاکنون محققین زیادی باکتری های بومی جدا شده از رسوبات جنگل های مختلف حرا را از نظر قدرت تجزیه ترکیبات PAH مورد بررسی قرار داده اند. از جمله رامسی (Ramsay) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش دادند که تعداد باکتری های تجزیه کننده آروماتیک در رسوبات حرا بسیار بالاست ($10^4$ تا $10^6$ سلول در هر گرم رسوب) که دارای پتانسیل قابل توجهی در تجزیه آلودگی های نفتی اند و این تعداد با اضافه کردن نفت می تواند افزایش یابد (۱۰).

تیان (Tian) و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان تجزیه فنانترن، فلورانتن و بنزوآپیرن را توسط باکتری های جدا شده از رسوبات حرا در چین اندازه گیری نمودند. به طوری که فنانترن به میزان ۱۰۰٪، بنزوآپیرن ۴۴/۲٪ و فلورانتن بیش از ۲۰٪ پس از ۱۰ روز گرماگذاری توسط باکتری های جدا شده تجزیه شد (۱۲). یو (Yu) و همکاران در سال ۲۰۰۵ باکتری های بومی ساکن در جنگل های حرای هنگ کنگ را جداسازی نمودند که این باکتری ها پس از ۴ هفته گرما گذاری توانستند ۹۹٪ از فلورن و فنانترن و حدود ۳۰٪ از پیرن را تجزیه نمایند (۲۶).

همچنین تام (Tam) و همکاران در سال ۲۰۰۳ رسوبات سطحی دو جنگل حرا را برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده PAH بررسی نمودند که کنسرسیوم غنی شده با فلورانتن تجزیه کمتر از ۴۰٪ فلورانتن را نشان داد (۱۱). گو (Guo) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نمونه های رسوبات سطحی چند جنگل حرا را بررسی نمودند و توانایی باکتری های جدا شده در تجزیه PAH را مورد ارزیابی قرار داد که باکتری *اسفنگوموناس* حدود ۶۰٪، *رودوکوکوس* حدود ۳۰٪ و *پاراکوکوس* ۱۰۰٪ از فلورانتن را تجزیه نمودند (۱۰).

با توجه به منحنی رشد باکتری های جدا شده در پژوهش جاری، باکتری ها در مجاورت فلورانتن هیچ فاز تاخیری را نشان ندادند و به سرعت وارد فاز لگاریتمی شده اند. این مساله نشان می دهد که این باکتری ها توانایی تجزیه فلورانتن را به عنوان منبع کربن و انرژی را به خوبی دارا بوده اند. بنابراین جمعیت میکروبی از طریق تقسیم سلولی ازدیاد می یابند. با اندازه گیری دانسیته نوری امکان ارزیابی افزایش رشد میکروبی وجود دارد. همچنین پس از آن باکاهش منبع کربن و تغذیه، رشد باکتری ها نیز کاهش می یابد (۲۷). در این پژوهش بیشترین میزان دانسیته نوری مربوط به *باسیلوس سیرکولانس* بود.

## نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد باکتری های تجزیه کننده فلورانتن پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند و رسوبات جنگل های حرای واقع در پارک ملی دریایی نای بند دارای تعداد زیادی از باکتری های یاد شده است. دو باکتری *باسیلوس سیرکولانس* و *آلکالیژنز فکالیس* از نظر فراوانی و همچنین از نظر قدرت تجزیه هیدروکربن مورد آزمایش در رتبه اول قرار داشتند. بر این اساس این دو باکتری را می توان به عنوان باکتری های بومی منطقه در نظر گرفت. با توجه به این که حذف زیستی آلاینده ها رویکردی درجهت حفظ محیط زیست می باشد، بنابر این باید توجه نمود که از میکروارگانسیم های جدا شده که توانایی خوبی را در تجزیه فلورانتن نشان داده اند می توان جهت کاربرد نهایی در رفع آلودگی های نفتی رسوبات جنگل حرا استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، به دلیل حمایت های مالی این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References


**1.** Pardakhti A, Esmaili Sari A, Islami E. Quality And quantity of polycyclic aromatic hydrocarbons in Tehran air in summer 2002. J Environ Studies. 2004; 30(33): 16-20. [In Persian]

**2.** Wang Z, Chen J, Yang P, Qiao X, Tian F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dalian soils: distribution and toxicity assessment. J Environ Monit. 2007; 9(2): 199-204.

**3.** Cocchieri RA, Arnese A, Minicucci AM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coast. Mar Pollut Bull. 1990; 21(1): 15-18.

**4.** Bostrom CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Tornqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. Environ Health Perspect. 2002; 110(3): 451-488.

**5.** WHO. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in air quality guidelines for Europe. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1987; 23: 105-107.

**6.** Akhavan Sepahi A, Dejban Golpasha I, Nakhoda AM. Utilization and biodesulfurization crude oil by *Bacillus* spp. J Microb World. 2009; 1(1): 5-13. [In Persian]

**7.** Reda AB. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. J Appl Sci. 2009; 5(2): 197-211.

**8.** Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res Public Health. 2009; 6(1): 278- 309.

**9.** Liu H, Yang C, Tian Y, Lin G, Zheng T. Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP. Mar Pollut Bull. 2010; 60(11): 2056-2061.

**10.** Guo CL, Zhou HW, Wong YS, Tam NF. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Mar Pollut Bull. 2005; 51(8-12): 1054-1061.

**11.** Tam NF, Guo CL, Yau C, Ke L, Wong YS. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial cocsortia enriched from mangrove sediments. Water Sci Technol. 2003; 48(8): 177-183.

**12.** Tian Y, Liu HJ, Zheng TL, Kwon KK, Kim SJ, Yan CL. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. Mar Pollut Bull. 2008; 57(6-12): 707-715.

**13.** Udeani TKC, Obroh AA, Okwuosa CN, Achukwu PU, Azubike N. Isolation of bacteria from mechanic work shop soli environment contaminated with used engine oil. Afr J Biotechnol. 2009; 8(22): 6301-6303.

**14.** Mashreghi M, Mashreghi K. Characterization of bacteria degrading petroleum derivatives isolated from contaminated soil and water. J Sci IR Iran. 2005; 16(4): 317- 320. [In Persian]

**15.** Nnamchi CI, Obeta JAN, Ezeogu LI. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int J Environ Sci Tech. 2006; 3(2): 181-190.

**16.** Kafilzadeh F, Farhangdost MS, Rezaeian Jahromi AA, Mahjor AA. Assessment of biological modification of phenol using native bacteria isolated from water and sedment of Parishan Lake. J Microb World. 2009; 2(2): 89-96. [In Persian]

**17.** Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenantherene- degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Ann Microbiol. 2005; 55(4): 255-259.

**18.** Sanders ER, Miller JH. Imicrobiologist: a discovery-based cours in microbial ecology and molecular evolution. ASM Press, Washington DC. 2010; 20036-2904.

**19.** Emtyazjoo M, Siddighi S, Emtyazjoo M. Bioremediation anthracene in siri Island with an emphasis biosafety. J Environ Sci Technol. 2009; 11(3): 257-268. [In Persian]

**20.** Zhuang WQ, Tay JH, Maszenan AM, Krumholz LR, Tay ST. Importance of gram positive naphthalene degrading bacteria in oil contaminated tropical marine sediments. Lett Appl Microbiol. 2003; 36(4): 251-257.

**21.** Eduk SI, Ebong GA, Udoinyang EP, Njoku JN, Eyen EA. Bacteriological and polycyclic aromatic hydrocarbons accumalation in mangrove oyster from Douglas creek, Nigeria. Pak J Nutr. 2010; 9(1): 35-42.

**22.** Kafilzadeh F, Rafiee S, Tahery Y. Evaluation of bioremediation of naphthalene using native bacteria isolated from oil contaminated soils in Iran. Ann Biol Res. 2011; 2(6): 610-616.

**23.** Lors C, Damidot D, Ponge J, Perie F. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. Environ pollut. 2012; 165: 11-17.

**24.** Survery S, Ahmad S, Subhan SA, Ajaz M, Rasool SA. Hydrocarbon degrading bacteria from Pakistani soil: isolated, identification, screening and genetical studies. Pak J Biol Sci. 2004; 7(9): 1518-1522.

**25.** Arbabi M, Nasseri S, Anyakora C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum contaminated soils. Iran J Chem Eng. 2009; 28(3): 53-59.

**26.** Yu KSH, Wong AHY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY. Natural attenuation biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar Pollut Bull. 2005; 51(8-12): 1071-1077.

**27.** Kader J, Sannasi P, Othman O, Ismail BS, Salmijah S. Removal of Cr (VI) from aqueous solutions by growing and non-growing populations of environmental bacterial consortia. Global J Environ Res. 2007; 1(1): 12-17.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

# Biodegradation of fluoranthene by indigenous bacteria isolated from sediments of mangrove forests in Persian Gulf

**Farshid Kafilzadeh[1], Parvin Amiri[2], Atefeh Rezaei[2], Narges Ahmadi[3]**

[1] Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3] M.Sc., Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

## Abstract

*Background and Objectives*: Polycyclic aromatic hydrocarbons are a group of organic compounds with two or more aromatic rings, and approximately 90 percent of these compounds are carcinogen. Although there are different methods to clear such contaminants from environment, microorganisms are more effective and more cost friendly. This study was designed to isolate indigenous microorganisms which are able to biodegradation fluoranthene from sediments of mangrove forests in Persian Gulf and to evaluate their biodegrading ability on fluoranthene.

*Materials and Methods:* This sectional study was performed on the sediment samples collected from Persian Gulf mangrove. The bacteria were counted in two series of media; one containing fluoranthene and another one without any contaminants. The degrading bacteria were isolated on two basic mineral media (MSM and MSM Agar). The degradation ability were assayed based on High pressure liquid chromatography (HPLC).

*Results:* The total number of bacteria grown on the medium without Fluoranthene was significantly more than those contaminated with Fluoranthene (cfu/g). Among the isolated bacteria *Bacillus circulance*, *Alcaligens fecalis, Entrobacter*, *Listeria* and *Staphylococcus* showed the highest ability to degrade Fluoranthene. *Bacillus circulance* and *Alcaligens fecalis* showed the most biodegrading activity and growth at the presence of fluoranthene (73.4% and 71%, respectively).

*Conclusion:* Results of this study indicate that there are many fluoranthene degrading bacteria in Persian Gulf mangrove sediments.

*Keywords:* Bioremediation, Fluoranthene, *Bacillus circulans*, Mangrove.

**Correspondance to**: Farshid Kafilzadeh

Tel: +989171140799

E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 157-167.