فـصـلنامـه علمی ـ پژوهشی علـوم‌محیـطی، دوره یازدهم، شـمـاره ۳، پائیز ۱۳۹۲
Environmental Sciences Journal, Vol. 11, No. 3, Fall 2013

جداسازی باکتری‌های مقاوم به آنتراسن خورموسی و مطالعه رشد و توانایی آن‌ها در تولید بیوسورفکتانت

فاطمه شاه علیان*[۱]، علیرضا صفاهیه[۲]، نگین سلامات[۲]، فاطمه موجودی[۳] و مصطفی زارع دوست[۴]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی دریا، گرایش آلودگی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی
[۲] استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
[۳] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
[۴] دانشجوی دکتری مدیریت محیط‌زیست، دانشکده محیط زیست و انرژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ... تاریخ چاپ:.....

چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی آلاینده‌هایی هستند که از منابع مختلف به‌ویژه ریزش‌های نفتی به اکوسیستم دریایی راه پیدا می‌کنند و به‌راحتی تجزیه نمی‌شوند. یک راه عملی در حذف آلودگی‌های نفتی، استفاده از میکروارگانیسم‌ها در زیست‌پالایی[۱] است. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها با تولید بیوسورفاکتانت باعث افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها از طریق ازدیاد میزان انحلال‌پذیری آن‌ها در فاز آبی می‌شوند در حالی که همه میکروارگانیسم‌ها این قابلیت را ندارند. به‌منظور مقایسه رشد و تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های ساکن در رسوبات آلوده خور موسی، نمونه‌های رسوب از منطقه نمونه‌برداری و دو گونه باکتریایی AD2 و AD6 جداسازی و خالص‌سازی شد. گونه‌های فوق براساس مورفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی به‌عنوان سودوموناس استاتزری و آلکالیجنز دنیتریفیکانس شناسایی شدند. به‌منظور سنجش رشد باکتری‌ها کدورت محیط کشت با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب نوری محیط‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بررسی تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از سه روش Blood agar، Drop collaps، Oil spread انجام شد. طبق یافته‌ها این گونه‌ها در محیط حاوی آنتراسن، به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی از رشد خوبی برخوردار بودند ولی نتایج نشان داد که رشد باکتری سودوموناس استاتزری به‌عنوان باکتری مولد بیوسورفاکتانت و به‌دلیل بالا بردن میزان حلالیت آنتراسن و افزایش دسترسی زیستی این هیدروکربن در محیط نسبت به باکتری آلکاجینز دنیتریفیکانس بالاتر بود.

کلمات کلیدی: ترکیبات آروماتیک حلقوی، سودوموناس استاتزری، آلکالیجنز دنیتریفیکانس، رشد، بیوسورفاکتانت.

Isolation of anthracene resistant bacteria from musa creek and scrutiny their growth and ability in biosurfactant production

Fatemeh Shahaliyan, [*1] Alireza Safahieh,[2] Negin Salamat,[3] Fatemeh Mojodi [4] and Mostafa Zaredoost[5]

[1] *MSc Student in Marin Pollution, Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Science and Ttechnology*
[2] *Department of Marine Biology, School of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Ttechnology*
[3] *Department of Marine Biology, School of Marine Science Khorramshahr University of Marine Science and Ttechnology*
[4] *Department of Marine Biology, Marine Pollution master of Science, Khorramshahr University of Marine Science and Ttechnology*
[5] *Head of Maritime Safety and Environmental Protection Department, Imam Khomeini Port.*

Abstract

The Poly aromatic hydrocarbons (PAH_S) are one of the most important kinds of pollutants that go through the marine ecosystems mains via anthropogenic activities (oil sources such as oil spills). One important practical method for oil pollution elimination is the use of microorganisms in biodegradation. Biosurfactant production by microorganism's result in increase of biodegradation via increase of their solubility in liquid phase. However, this ability to all microorganism's. To comparison growth and biosurfactant production ability of bacteria presented in contamination deposits of musa creek, the deposit sample was taken from polluted area. Two bacteria species AD2 and AD6 were purified and isolated. The isolates were identified as *Psedomonas stutzeri* and *Alcaligenes denitrificans* with morphological and biochemical tests. To intent of bacterial growth assay optical density were measured in 600 nm by spectrophotometer. Biosurfactant evaluations were performed by Blood agar, Drop collapse and Oil spread methods. *Psedomonas stutzeri* showed biosurfactant production potentials. According to results, *Psedomonas stutzeri* has a good growth in the media containing Antheracene as sole source of carbon and energy. also data demonstrated that the growth of biosurfactant producing bacteria *(Psedomonas stutzeri)* was better than *Alcaligenes denitrificans* due to increase of Antheracene solubility and enhance at its bioavailability in the media.

Keywords: Poly Aromatic Hydrocarbons, *Psedomonas Stutzeri*, *Alcaligenes Denitrificans*, Growth, Biosurfactant.

* Corresponding author. *E-mail Address*: shahaliyanfatemeh@yahoo.com

مقدمه

افزایش جمعیت کره زمین منجر به بالا رفتن تقاضا برای انرژی شده، و به‌تبع این افزایش تقاضا بر فعالیت‌های انسانی درخصوص عملیات حفاری، اکتشاف و استخراج نفت به‌طور چشمگیری افزوده شده است. فعالیت‌های انسانی در زمینه استخراج نفت و صنایع وابسته به آن نظیر حمل و نقل دریایی موجب ورود مقادیر متنابهی از هیدروکربن‌های نفتی و انتشار آن‌ها در اکوسیستم‌های دریایی می‌شود. ورود این هیدروکربن‌ها به منابع آبی می‌تواند خطرات زیست‌محیطی جدی در بر داشته باشد [۱ و ۲]. ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای گروهی از ترکیبات نفتی‌اند که به‌دلیل حلالیت اندک در آب، در رسوبات تجمع می‌کنند. این ترکیبات در محیط از پایداری نسبتاً زیادی برخوردارند و از آنجا که محلول در چربی‌اند قادرند پس از ورود به بدن جانداران در طی زنجیره غذایی از یک مصرف‌کننده به مصرف‌کننده‌های بعدی انتقال پیدا کنند [۳]. در بین این ترکیبات آنتراسن یکی از هیدروکربن‌های سه‌حلقه‌ای است که نظیر سایر هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آب‌گریز است و به علت سمیت و سرطان‌زایی می‌تواند اثرات نامطلوبی بر آبزیان داشته باشد [۴].

پاک‌سازی اکوسیستم‌های آبی از این‌گونه مواد نفتی از بروز بسیاری از آسیب‌های ناخواسته به جانداران جلوگیری می‌کند. سوزاندن، جداسازی فیزیکی، جذب، غوطه‌وری و امولسیون‌سازی از جمله روش‌های حذف آلاینده‌های نفتی از محیط‌زیست دریا محسوب می‌شوند. اما استفاده از روش‌های زیستی مقرون به صرفه بوده و به دلایلی، همچون سازگاری بیشتر با محیط‌زیست، نیاز به تجهیزات کم‌تر و تولید پسماندهای کم‌خطر و در بعضی موارد راندمان بالاتر از سایر روش‌ها مورد توجه هستند [۱]. زیست‌پالایی روشی است که در آن از توانایی موجودات به‌منظور افزایش سرعت و میزان تخریب آلاینده‌ها استفاده می‌شود. این شیوه ابزاری مناسب برای کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی به شمار می‌رود [۵].

یکی از روش‌های زیست‌پالایی استفاده از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌ها در محیط‌زیست است. در برخی از این میکروارگانسیم‌ها با تولید ترکیبی به‌نام بیوسورفکتانت، قابلیت زیست‌پالایی افزایش می‌یابد. بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی هستند که به‌دلیل خاصیت آمفی‌پاتیک باعث کاهش کشش سطحی و بین سطحی می‌شوند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های واجد هیدروکربن‌ها موادی از خود ترشح می‌کنند که بیوسورفکتانت[۲] نامیده می‌شوند. این مواد که موجب کاهش کشش سطحی آب می‌شوند، با تشدید امولسیون شدن چربی‌ها در محیط آبی [۶ و ۷]، باعث افزایش سطح تماس آنزیم‌های سلول با هیدروکربن‌ها شده و تجزیه آن‌ها را تسریع می‌کنند. لذا می‌توان از این ویژگی میکروب‌ها در تسریع حذف هیدروکربن‌های مضر (هیدروکربن‌های نفتی) از محیط بهره برد [۸].

خور موسی در بندر امام خمینی محل بارگیری نفت و تردد کشتی‌هاست و آلودگی ترکیبات نفتی بالایی دارد. مکان‌های آلوده، در مقایسه با مکان‌های غیر آلوده، دارای جمعیت بیشتری از ارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌های آلی است. از این رو جمعیت‌های مذکور نسبت به سایرین توانایی بالایی در تجزیه آلاینده‌ها از خود نشان می‌دهند. این ارگانیسم‌ها به‌دلیل قرارگیری طولانی در معرض آلاینده‌ها با محیط سازگار شده‌اند و تنش‌های محیطی باعث انتخاب آن‌ها شده است. در راستای پاک‌سازی مکان‌های آلوده، استفاده از روش زیست‌پالایی، شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آلاینده ضروری است. در تحقیق حاضر رشد و تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری‌های جداسازی شده از رسوبات آلوده به ترکیبات نفتی در حضور آنتراسن مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

به‌منظور شناسایی و جداسازی باکتری‌های بومی منطقه خورموسی ایستگاه‌های نمونه‌برداری براساس نزدیکی به تأسیسات نفتی، پتروشیمی و مناطق آلوده به ترکیبات نفتی انتخاب شدند. نمونه‌برداری با ۳ تکرار، توسط گرب از رسوبات سطحی منطقه تحت جزر و مدی[۳] خور موسی در سه ایستگاه مختلف، شامل داک سرسره (″۳۴/۸۵ ′۲۵ °۳۰ شمالی و ″۴۹/۷۷ ′۰۴ °۴۹ شرقی) ایستگاه ۱، پتروشیمی (″۲۶/۷۳ ′۲۵ °۳۰ شمالی و ″۹/۳۱ ′۵۰ °۴۹ شرقی) ایستگاه ۲، اسکله بارگیری مواد نفتی (″۳۴/۲۴ ′۲۷ °۳۰ شمالی، ″۳۱/۳۴ ′۰۱ °۴۹ شرقی) ایستگاه ۳ برداشت شد. نمونه‌های رسوب درون ظروف شیشه‌ای درب‌دار استریل ریخته شده و پس از قرار دادن روی یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۱- آماده‌سازی رسوبات

بعد از انتقال رسوبات به آزمایشگاه تحت شرایط استریل، ۳ تکرار از نمونه‌های رسوب مربوط به هر ایستگاه ترکیب شد. با توجه به دریایی بودن باکتری‌ها برای سازگارکردن آن‌ها با شرایط آزمایش ۱۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد به ۱ گرم از رسوبات هر ایستگاه به‌طور جداگانه اضافه شد. به‌دلیل احتمال وجود فراوان باکتری‌ها در رسوبات نمونه‌برداری شده، رقیق‌سازی نمونه‌ها با استفاده از محلول نمک فوق تا رقت 10^{-1} انجام شد [۹ و ۱۰].

۲-۲- غنی‌سازی

برای افزایش جمعیت‌های میکروبی سازگار با آنتراسن از کل باکتری‌های موجود طبق روش زیر عمل شد: ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی از رقت 10^{-1} به محیط‌های کشت پایه معدنی مایع[۴] (MSM) حاوی: (گرم برلیتر) (۵ گرم) NH_4Cl، (۲/۵ گرم) $K_2HPO_4,3H_2O$، (۱ گرم) $MgSO_4,7H_2O$، (۰/۰۵گرم) $FeSO_4,7H_2O$، (۰/۰۵ گرم) $CaCl_2, 2H_2O$، ۱۰۰ میکرولیتر عناصر کم‌مقدار و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و آنتراسن به‌عنوان تنها منبع کربن اضافه شد. مایع مذکور در تعدادی ارلن ریخته شد. pH محیط‌های کشت روی ۷ تنظیم شد و سپس برای استریل کردن، ارلن‌های حاوی محیط کشت به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند [۱۱].

محیط‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با دور rpm ۱۵۰ نگه‌داری شد. با کدر شدن رنگ مایع، ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت به محیط MSM جدید منتقل شد و تا ۳ هفته عمل تجدید کشت با شرایط فوق تکرار شد [۱۱].

۲-۳- جداسازی باکتری‌ها

۱ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاصل از آخرین مرحله غنی‌سازی روی تعدادی پتری‌دیش[۵] (ظرف مخصوص کشت) حاوی محیط کشت جامد MSM به‌صورت پورپلیت[۶] کشت داده و محیط‌ها به‌مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. باکتری‌هایی که قادر به استفاده از آنتراسن به‌عنوان تنها منبع کربن بودند، به‌صورت کلونی‌های متفاوت مشاهده شدند [۹].

۲-٤- خالص‌سازی باکتری‌ها

برای خالص‌سازی باکتری‌ها، کلونی‌هایی را که از نظر ظاهری متفاوت بودند به‌صورت متوالی روی محیط کشت جامد MSM حاوی آنتراسن به‌روش خطی کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور انکوبه شدند تا سرانجام در هر پلیت کلونی‌های خالص هر باکتری به دست آمد [۱۰].

۲-۵- اندازه‌گیری میزان رشد باکتری

برای اندازه‌گیری میزان رشد باکتری، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع MSM به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری افزوده و استریل شدند. باکتری‌های به دست آمده از مرحله خالص‌سازی به محیط کشت منتقل شده و مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. در پایان ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت حاوی باکتری به‌مدت ۲۰دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. نمونه‌های سانتریفوژ شده دو بار، و هر بار با استفاده از ۵ میلی‌لیتر از محیط MSM شسته شدند. پس از شست‌وشو، باکتری‌ها در ۴ میلی‌لیتر از محیط MSM به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. برای سنجش کدری حاصل از رشد باکتری‌ها، تعداد کافی از ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری متناسب با نمونه‌های باکتری و نمونه‌های شاهد آماده شد. نمونه‌های شاهد فاقد باکتری بودند. ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MSM به ارلن‌ها افزوده شد. درب ارلن‌ها با استفاده از پنبه و فویل پوشانده شده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر در دستگاه اتوکلاو استریل شدند. پس از خارج کردن ارلن‌ها از اتوکلاو و رسیدن دمای محیط‌های کشت به دمای آزمایشگاه، ابتدا ۳۰ میلی‌گرم برلیتر هیدروکربن آنتراسن، و پس از ۲ ساعت ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از انکوباتور شیکردار انکوبه شدند [۱۲].

رشد باکتری‌ها به مدت ۱۲ روز در فواصل زمانی ۲۴ ساعته در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. مرحله اول سنجش در زمان صفر، که باکتری به محیط کشت اضافه شد، انجام گرفت. ۰/۶ میلی‌لیتر از محلول باکتری با ۲/۴ میلی‌لیتر از محلول MSM استریل، رقیق شد. در ابتدا و قبل از اندازه‌گیری رشد نمونه‌ها برای صفر کردن دستگاه ۳ میلی‌لیتر از نمونه محیط کشت MSM فاقد باکتری به

دستگاه اسپکتروفتومتر داده شد. سپس سل‌های حاوی محلول مورد نظر برای سنجش در دستگاه قرار گرفت. همین مراحل برای سنجش نمونه‌های شاهد نیز تکرار شد با این تفاوت که ۰/۶ میلی‌لیتر از ارلن‌هایی که فقط حاوی باکتری یا آنتراسن بودند، برداشت شد [۱۱].

۲-۶- شناسایی باکتری‌ها

به‌منظور شناسایی اولیه باکتری‌ها، خصوصیات ظاهری کلونی آن‌ها به‌صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم نوع باکتری‌ها مشخص شد. علاوه بر آن برای شناسایی دقیق‌تر باکتری‌ها از آزمون‌های معمول بیوشیمیایی ــ نظیر KOH، اکسیداز، کاتالاز، TSI، اوره‌آز، سیمون‌سیترات، اندول، متیل‌رد، VP، فنیل‌آلانین، رشد در محیط کشت مک‌کانکی، حرکت، احیای نیترات، دکربوکسیلاز ــ استفاده شد [۱۳]. سپس برای بررسی تولید بیوسورفاکتانت از سه روش Blood agar، Drop collaps، Oil spread استفاده شد [۱۴].

الف) روش Blood agar: هر ایزوله به‌صورت جداگانه بر پلیت‌های حاوی Blood agar کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. هاله روشن اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخص تولید بیوسورفاکتانت به‌صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. وجود هاله روشن به‌معنی لیز شدن گلبول‌های قرمز محیط توسط باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت است، لذا شعاع هاله ایجاد شده نمایان‌گر میزان قابلیت باکتری در تولید بیوسورفکتانت است: عدم همولیز (-)، همولیز ناکامل (+)، همولیز کامل با قطر دایره کوچک‌تر از ۱cm (++)، همولیز کامل با قطر دایره بین ۱cm تا ۳ (+++)، همولیز کامل با قطر دایره بیشتر از ۳cm (++++) نشان داده شدند [۱۴].

ب) روش Drop collaps: مقدار ۲ میکرولیتر نفت معدنی[۷] روی یک اسلاید تمیز ریخته و پس از یک ساعت ۵ میکرولیتر از محیط کشت به سطح نفت افزوده شد. پس از ۱ دقیقه شکل قطره نفت مورد بررسی قرار گرفت و براساس پخش جزئی تا کامل نفت بر سطح محیط کشت از (+) تا (++++) امتیاز داده شد. به محیط‌های حاوی حلقه‌های گرد امتیاز کم‌تری داده شد چرا که نشان‌دهنده تولید بیوسورفاکتانت اندک بود [۱۴].

ج) روش Oil spread: در این روش ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبارتقطیر را در یک پتری‌دیش بزرگ ریخته و به دنبال آن ۲۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آب افزوده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت بر سطح نفت اضافه شد. ظهور هاله شفاف بر سطح نفت نشان‌گر تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری تلقی شد [۱۴].

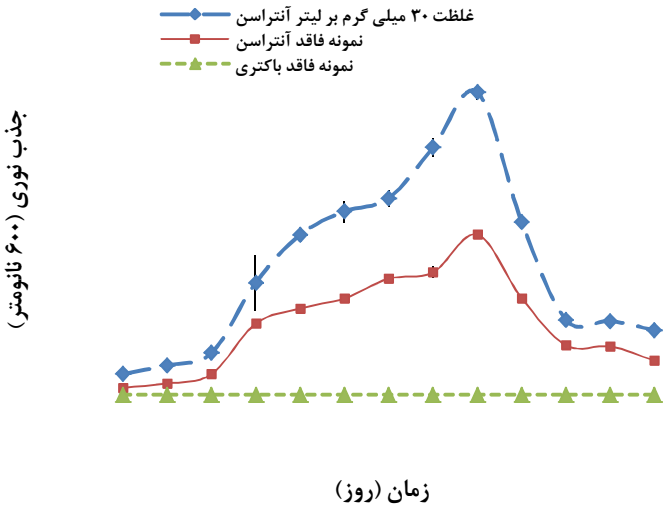
۳- نتایج و بحث

محیط‌های دریایی از گسترده‌ترین اکوسیستم‌های روی زمین محسوب می‌شوند که محل زیست گروه‌های متنوعی از میکروارگانسیم‌ها (ریزاندامگان) هستند. مطالعات نشان می‌دهد که برخی از این گونه‌ها قادر به تجزیه آلاینده‌های وارد شده به محیط دریا هستند [۱۵ و ۱۶]. در مطالعه حاضر دو گونه باکتریایی بومی خلیج فارس با نام‌های اختصاری AD2 و AD6 که قادر به تجزیه آنتراسن به‌عنوان تنها منبع کربن بودند، از رسوبات آلوده به این ترکیبات جداسازی و خالص‌سازی شدند. این باکتری‌ها جز باکتری‌های گرم منفی و سیترات، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. بر پایه انطباق نتیجه آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده با کتاب راهنمای سیستماتیک برگی، باکتری‌های تجزیه‌کننده به‌عنوان گونه‌های سودوموناس استاتزری[۸] و آلکالیجنز دینیتریفیکانس[۹] شناخته شدند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

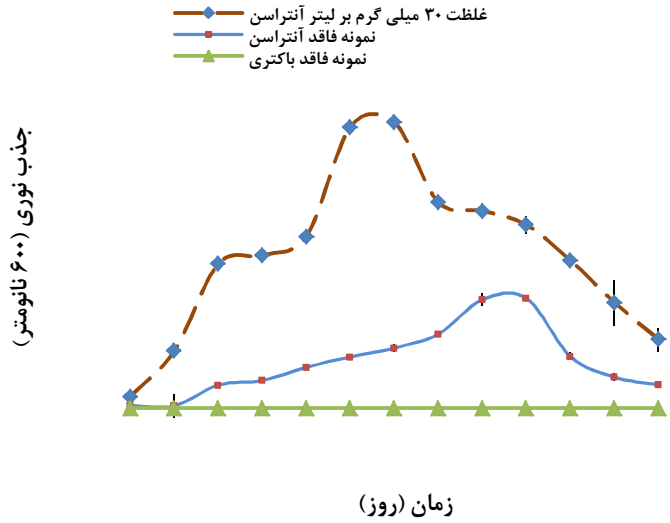
جدول ۱- مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی دو گونه باکتری منتخب

آزمون	AD2	AD6
رنگ آمیزی گرم	-	-
آزمایش KOH	+	+
سلول	میله‌ای	میله‌ای
اکسیداز	+	+
کاتالاز	+	+
TSI	+	+ -
اوره	-	+
سیمون سیترات	+	+
تولید اندول	-	-
متیل رد	+	+
VP	-	+
فنیل‌آلانین	-	-
مک‌کانکی	+	-
حرکت	+	-
احیای نیترات	+	+
د-کربوکسیلاز	-	-

نتایج آزمایشات رشد دو باکتری در محیط مـایع MSM در شکل ۱ و ۲ آمده است. منحنی رشد بـاکتری‌هـا بـه‌وضـوح نشان می‌دهد که رشد نمایی باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکـانس پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون انجام گرفت و به‌تـدریج بعـد از روز هشتم وارد فاز مرگ شد (شکل۱). منحنـی رشـد بـاکتری سودوموناس استاتزری نیز نشان می‌دهد که رشد باکتری فاقد فاز تأخیری بوده و در روز پنجم به بیشترین میزان خود رسید، ولی پس از آن زمان منحنی روند نزولی گرفته و رشـد بـاکتری با شیب تندی کاهش یافت (شـکل۲). مقایسـه منحنـی رشـد نمونه دارای باکتری و آنتراسن با نمونه فاقد آنتراسن نشـان داد که باکتری در محیط واجد آنتراسن از رشد بیشتری برخـوردار است (شکل ۱و۲).

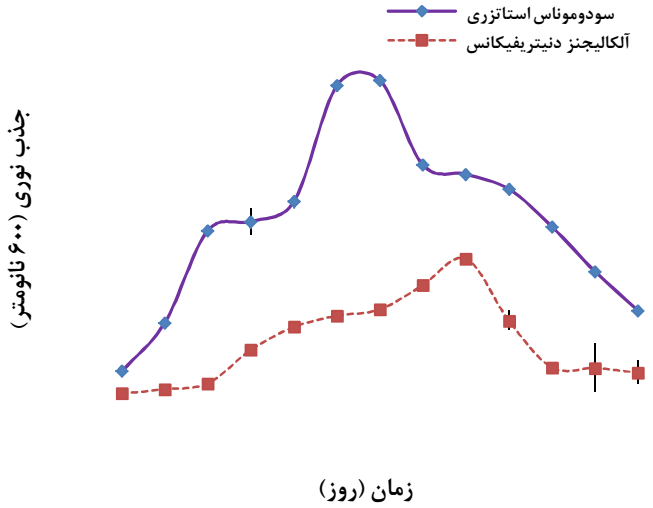


شکل ۱- منحنی رشد باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس در محیط کشت مایع MSM حاوی آنتراسن



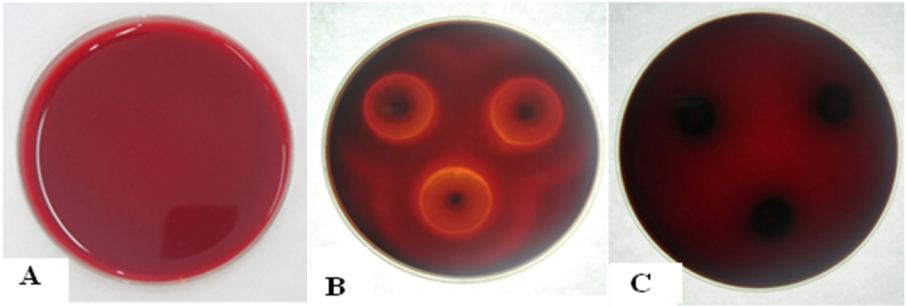
شکل ۲- منحنی رشد باکتری سودوموناس استاتزری در محـیط کشـت حاوی آنتراسن

با توجه به شکل ۳، باکتری سودوموناس استاتزری برخلاف باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس دارای فاز تاخیری نیست و رشد خود را از همان ساعات اولیه تلقیح انجام داده و همچنین از رشد بیشتری نسبت به باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس برخوردار بود. این باکتری در روز پنجم به اوج رشد خود رسید، در حالی که رشد باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس نسبت به باکتری سودوموناس استاتزری نقطه اوج پایین‌تری داشت.

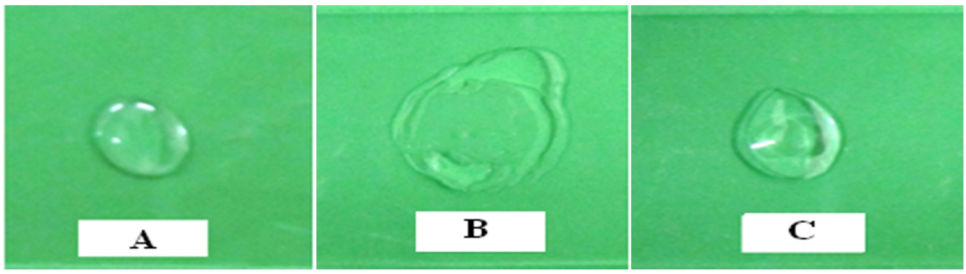


شکل ۳- مقایسه منحنی رشد باکتری‌های سودوموناس استاتزری و آلکالیجنز دنیتریفیکانس در محیط کشت حاوی آنتراسن

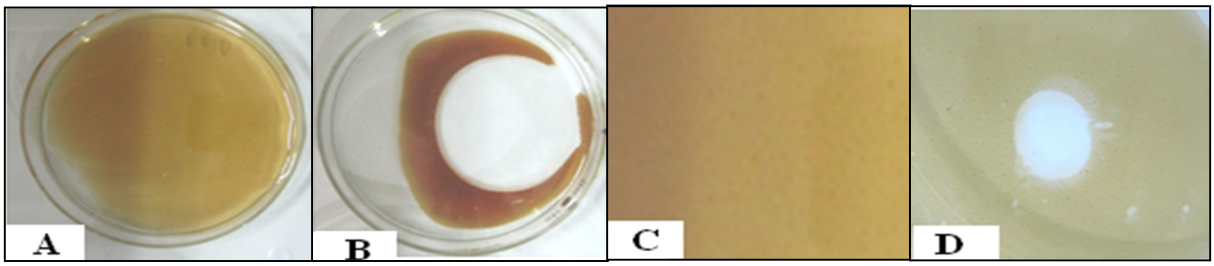
در این مطالعه فعالیت همولیز دو ایزوله با استفاده از روش Blood agar وکاهش کشش سطحی و بین سطحی با استفاده از تکنیک‌های Drop collaps و Oil spread اندازه‌گیری شد. نتایج تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری سودوموناس استاتزری با سه تکنیک استفاده شده به‌صورت Blood agar(+++)، Drop collaps (++) و در تکنیک Oil spread قطر هاله ایجاد شده بر سطح نفت خام برابر ۲ سانتی‌متر مشخص و تأیید شد. در حالی که باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس نسبت به تکنیک‌های Blood agar و Drop collaps پاسخ (-) نشان داد. قطر هاله تشکیل شده بر سطح نفت خام توسط این گونه نیز معادل ۰/۷ سانتی‌متر به دست آمد. لذا استنباط می‌شود که باکتری سودوموناس استاتزری با تولید بیوسورفکتانت قادر به کاهش کشش سطحی آب باشد که در این صورت هیدروکربن را با سرعت بیشتری نسبت به باکتری آلکالیجنز دنیتریفیکانس مصرف خواهد کرد. تکنیک‌های فوق به‌صورت شماتیک در اشکال ۴، ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل ۴- رشد دو باکتری *Psedomonas stutzeri* (ب) و *Alcaligenes denitrificans* (ج) روی محیط Blood agar. محیط شاهد فاقد باکتری (الف). هاله روشن اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده همولیز خون توسط باکتری است (ب). عدم وجود هاله نشانه فقدان همولیز توسط باکتری (ج).



شکل ۵- شاهد فاقد باکتری (الف). پخش جزئی تا کامل نفت معدنی در تکنیک Drop collaps توسط *Psedomonas stutzeri* (ب) و *Alcaligenes denitrificans* (ج).



شکل ۶- ظهور هاله شفاف بر سطح نفت در تکنیک Oil spread توسط باکتری *Psedomonas stutzeri* (د) و عدم ظهور هاله توسط باکتری *Alcaligenes denitrificans* (ج) شاهد فاقد باکتری (الف) و شاهد حاوی سورفاکتانت (ب)

دو گونه باکتری متعلق به سویه‌های آلکالیجنز دنیتریفیکانس و سودوموناس استاتزری از گونه‌های غالب‌اند که به‌دلیل سازگاری بالا با شرایط محیطی در بسیاری از مناطق آلوده به مواد آلی با غلظت بالا یافت می‌شوند [۱۷]. جنس سودوموناس و آلکالیجنز توسط محققین گوناگونی از خاک، آب و رسوبات آلوده به نفت و هیدروکربن‌های نفتی جداسازی و خالص‌سازی شده‌اند. از جمله، برخی از آنان موفق به جداسازی و خالص‌سازی باکتری آلکالیجنز از خاک‌های آلوده نفتی شدند [۱۸]. طی یکی از مطالعات تجزیه زیستی (۲۰۰۳) نیز ۴ سویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا، که قادر به رشد بر نفت و استفاده از آن به‌عنوان منبع کربنی بودند جداسازی و شناسایی شد [۱۹]. همچنین باکتری‌های متعلق به گونه‌های مختلف، نظیر آلکالیجنز با توانایی استفاده از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای با وزن مولکولی پایین از رسوبات دریایی و آب آلوده جداسازی و خالص‌سازی شد [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر، ۵۰ گونه باکتری تجزیه‌کننده فنانترن که همگی متعلق به گونه سودوموناس بودند از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی پالایشگاه مرسین در ترکیه جداسازی و خالص‌سازی شد [۹]. هشت گونه باکتری که تحمل بالایی به غلظت‌های مختلف نفت از خود نشان دادند از آب و رسوبات آلوده نفتی رودخانه‌ای در ابرک[۱۰] چین، جداسازی شد. در بین ایزوله‌ها جنس آلکالیجنز هم قادر به رشد بر غلظت زیادی از نفت دیزل بود و توانایی تجزیه آن را به‌عنوان تنها منبع کربنی داشت [۱۶]. تحقیقات دیگری نشان داد که گونه‌های سودوموناس قادر به تجزیه آنتراسن هستند [۲۰]. علاوه بر آن، ۷۶ گونه مقاوم به آنتراسن جداسازی شد و از بین ۵ گونه، گونه سودوموناس به‌علت رشد بالا برای مطالعات تجزیه زیستی انتخاب شد [۲۱].

باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت قادرند حلالیت آلاینده‌های غیر قطبی مانند هیدروکربن‌های نفتی را افزایش دهند. این عمل با افزایش دسترسی زیستی باکتری‌ها به آلاینده، موجود را قادر می‌سازد که از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربنی به‌راحتی استفاده کرده و در کاهش سمیت آن‌ها نقش مهمی ایفا کنند [۷]. در مطالعه حاضر توانایی تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌های جدا شده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین دو باکتری مورد نظر تنها باکتری سودوموناس استاتزری قادر به تولید بیوسورفاکتانت است. گونه سودوموناس از جمله باکتری‌هایی است که در

مطالعات مختلف به‌عنوان تولیدکننده بیوسورفاکتانت معرفی شده است [۱۰ و ۲۲].

بیوسورفاکتانت‌های تولید شده توسط باکتری‌ها می‌توانند به‌طور مؤثری حلالیت هیدروکربن‌های آروماتیک را برای دسترسی بهتر توسط میکروارگانیسم‌های تولید آن‌ها بهبود بخشند [۲۳]. بالاتر بودن سرعت رشد باکتری سودوموناس استاتزری در محیط کشت حاوی آنتراسن نسبت به آلکالیجنز دنیتریفیکانس مبین این نکته است که بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری سودوموناس استاتزری باعث افزایش دسترسی زیستی باکتری به کربن موجود در آنتراسن شده و به همین دلیل این باکتری توانسته از کربن بیشتری نسبت آلکالیجنز استفاده کند. در مطالعات متعدد، باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت با توان رشد زیاد بر سوبسترای کربنی گزارش شد. مطالعه توانایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالن و فنانترن با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت نشان داد که تولید بیوسورفاکتانت با افزایش غلظت نفتالن و فنانترن محلول افزایش می‌یابد و باکتری‌ها با سرعت بخشیدن به حل شدن این سوبستراها، تجزیه‌پذیری آن‌ها را نیز افزایش می‌دهند [۶]. مطالعه گونه سودوموناس آئرژینوزا جداسازی شده نشان داد که با تولید یک نوع بیوسورفکتانت به‌نام رامنولیپید توسط این باکتری، دسترسی زیستی باکتری به فنانترن بیشتر شده و به همین دلیل می‌توان از این باکتری در پاکسازی بهتر مناطق آلوده استفاده کرد [۲۴]. پژوهش‌گران ۵ گونه باکتری تولیدکننده بیوسورفاکتانت را از مصبی در نیجریه جداسازی کردند. مطالعه عملکرد گونه‌های کورینه‌باکتریوم و سودوموناس آئروژینوزا روی هیدروکربن‌های نفت خام از جمله هگزادکان و دودکان مؤید این ادعاست که باکتری تولیدکننده بیوسورفاکتانت در محیط‌های مورد مطالعه رشد بیشتری نسبت به باکتری فاقد آن داشته است [۲۲]. همچنین آنان گونه سودوموناس فلورسنس با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت را جداسازی کردند. حلالیت آنتراسن توسط غلظت بیوسورفاکتانت ۳ تا ۷ برابر بیشتر از میزان حلالیت آن در آب شد [۲۵].

یکی از جنبه‌های جدید وکاربردی پاکسازی زیستی استفاده از میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفاکتانت است [۲]. در کلیه مطالعات ذکر شده از تولید بیوسورفاکتانت به‌عنوان یک توانایی ویژه برای باکتری‌ها یاد شده زیرا باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت به‌دلیل حل کردن مواد سوبسترا باعث می‌شوند که مواد کربنی بهتر در اختیار باکتری قرار گرفته و رشد باکتری‌ها نسبت به زمانی که بیوسورفاکتانت حضور ندارد بهتر صورت گیرد [۱۴ و ۲۲]. از این رو با افزایش حلالیت سوبستراهای مذکور، باکتری بهتر و سریع‌تر از آن‌ها استفاده کرده و سرعت تجزیه و در نتیجه پاکسازی محل‌های آلوده افزایش می‌یابد.

٤- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر هر دو گونه قادر به رشد در محیط حاوی آنتراسن، به‌عنوان تنها منبع کربنی هستند. با توجه به این که باکتری سودوموناس توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارد و نیز از رشد بالاتری برخوردار است می‌توان دیدگاهی مثبت در جهت استفاده از این گونه جداسازی شده برای پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به هیدروکربن آنتراسن داشت. از آنجا که در باکتری آلکالیجنز تولید بیوسورفکتانت وجود نداشته به نظر می‌رسد آنتراسن را کم‌تر متابولیزه کند، لذا استفاده از این‌گونه در تجزیه زیستی امیدبخش نخواهد بود.

تشکر و قدردانی

نگارنده مراتب تشکر خود را از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و اداره کل بنادر و دریانوردی استان خوزستان واقع در بندر امام خمینی (ره) به‌دلیل همکاری صمیمانه آنها تقدیم می‌دارد.

پی‌نوشت‌ها

1. Biodegradation
2. Microbial surface active agent
3. Sub tidal
4. Mineral salt medium
5. Petri dish
6. poor plate
7. Mineral oil
8. *Psedomonas stutzeri*
9. *Alcaligenes denitrificans*
10. Abereke

منابع

[1] Anisuddin S, Alhashar N, Tahseen S. Prevention of oil spill pollution in seawater using locally available materials. Arabian Journal for

Science Engineering; **2005**; **30**(2): 143-152.

[2] Christopher W M L, Richard H B, Sharyn E G, Albert L J. Isolation and identification pyrene mineralization *Mycobacterium spp*. from contaminated and uncontaminated sources. Applied and Environmental soil science; **2011**; **20**:1-11.

[3] Seo J S, Keum Y S, Li Q X. Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environmental Research, Public Health; **2009**; **6**: 278-309.

[4] Arun k, Ashok M, Rajesh S. Crude oil PAH constitution degradation pathway and associated bioremediation microflora: an overview. International Journal of Enviromental Science and Technology; **2011**; **1**(7): 1420-1439.

[5] Chorom M, Sharifi H S, Motamedi H. Bioremediation of a crude oil pollution application of fertilizations. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering; **2010**; **7**(4): 319-326.

[6] Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F, Bisaillon J G. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology; **1996**; **62**(6): 1908-1912.

[7] Anyanwu U, Chukwudi U. Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil. International Journal of Environmental Sciences; **2010**; **1**(2): 225-234.

[8] Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi T K, Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Science; **2008**; **94**(6.25): 736-747.

[9] Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of Microbiology; **2005**; **55**(4): 255-259.

[10] Kumar M, Leon V, Materano A D S, Ilzins O A. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. Polish Journal of Microbiology; **2006**; **55**: 139-146.

[11] Nnamchi C I, Obeta J A N, Ezeogu LI. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology; **2006**; **2**(3): 181-190.

[12] Malatova K. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in western New York State. M. S. thesis. Institute of Technology Rochester; **2005**. pp. 1-108.

[13] Garrity G M. In D.J. Brenner N.R. krig, J.T. Staley(ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Springer, New York; **2005**. 2c:323-384.

[14] Youssef N H, Duncana K E, Naglea D P, Savagea K N, Knappb R M, McInerney M J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods; **2004**; **56**: 339– 347.

[15] Pandey G, Jain R K. Bacterial Chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. Applied and Environmental Microbiology; **2002**; **68**(12): 5789-5795.

[16] Kayode T M, Eniola K I T, Olayemi A B, Igunnugbemi O O. Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. American-Eurasian Journal of Agronomy; **2008**; **1**(1): 06-09.

[17] Abd-Elsalam H E, Hafez E E, Hussain A A, Amany G A, El-Hanafy A A. Isolation and Identification of Three Rings Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) Degrading Bacteria. American-Eurasian Journal of Agricuttre and Environmental Science; **2009**; **5**(1): 31-38.

[18] Ilori M O N, Amund D I. Degradation of Anthracene by Bacteria Isolated from Oil Polluted Tropical Soils. Zeitschrift fur Naturforschung; **2000**; **55**c: 890-897.

[19] Okoh A I. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. African Journal of Biotechnolology; **2003**; **2**(5): 104-108.

[20] Al-Thani R F, Abd-El-Haleem D A M, Al-Shammri M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. African Journal of Microbiology Research; **2009**; **3**(11): 761-766.

[21] Kumar G, Singla R, Kumar R. Plasmid Associated Anthracene Degradation by *Pseudomonas* sp. Isolated from Filling Station Site. Nature and Science; **2010**; **8**(4): 89-94.

[22] Adebusoye S A, Amund O O, Ilori M O, Domeih D O, Okpuzor J..Growth and biosurfactant synthesis by Nigerian hydrocarbon-degrading estuarine bacteria. Revista de Biologin Tropical (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744); **2008**; **56**(4): 1603-1611.

[23] Helmy Q, Kardena E, Nurachman Z, Wisjnuprapto. Application of biosurfactant produced by *Azotobacter vinelandii* AV01 for enhanced oil recovery and biodegradation of oil sludge. International Journal of Civil and Environmental Engineering; **2010**; **10**(01): 7-13.

[24] Garcia-Junco M, De Olmedo E, Ortego-Calvo J J. Bioavailabilityof solid and non-aqueous phase liquid-dissolved phenanthrene to the biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. Environmental Microbiology; **2001**; **3**: 561-569.

[25] Abouseoud M,Yataghene A, Amrane A, Maachi R. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Hazardous Materials; **2010**; **180**: 131-136.