(مقالهٔ پژوهشی)

جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کنندهٔ فنانترن از خاک‌های آلوده به نفت خام در اطراف پالایشگاه آبادان و ارزیابی میزان رشد آنها

فرشید کفیل زاده[1*]، سیده زینب حسینی[2]، هوشنگ جمالی[3]

۱- دانشیار گروه زیست شناسی.
۲- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی.
۳- استادیار گروه زیست شناسی.

چکیده

زمینه و هدف: یکی از شایع‌ترین آلاینده‌های موجود در خاک هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای می‌باشند. این ترکیبات به‌علت پراکنش محیطی گسترده، سمیت، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ایجاد اختلالات جنینی از اهمیت خاصی برخوردارند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای پاک‌سازی آلودگی خاک می‌تواند مؤثر، ارزان و ایمنی محیطی را فراهم کند. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن از خاک‌های آلوده به نفت خام در اطراف پالایشگاه آبادان و بررسی سینتیک رشد آنها است.

روش بررسی: نمونه‌های خاک از ۳ جایگاه مختلف در اطراف پالایشگاه آبادان جمع‌آوری گردید. تعداد باکتری‌ها در دو محیط کشت نوترینت آگار حاوی فنانترن و بدون فنانترن شمارش گردید. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده فنانترن با کشت نمونه‌ها بر روی محیط پایه معدنی فنانترن براث و محیط فنانترن آگار صورت گرفت. سپس باکتری‌ها به‌وسیلهٔ آزمایش‌های تشخیص بیوشیمیایی شناسایی شدند. در نهایت با کشت باکتری‌ها در غلظت‌های ۰/۵ تا ۰/۸ گرم در لیتر فنانترن، توانایی تجزیهٔ زیستی فنانترن اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیشترین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده، ۰/۱۰ ± ۸/۰۸۳ در ایستگاه C و کمترین تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده، ۰/۱۰ ± ۵/۴۴۲ در ایستگاه B به‌دست آمد. در این تحقیق، به‌ترتیب از نظر فراوانی باکتری‌های *باسیلوس اسپی*، *سودوموناس ائروجینوزا*، *کورینه‌باکتریوم اسپی*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* جداسازی و شناسایی گردید. باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس بیشترین تجزیه و رشد را در غلظت‌های مختلف فنانترن داشتند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که خاک اطراف پالایشگاه آبادان دارای تعداد زیادی از باکتری‌های تجزیه‌کننده فنانترن به‌ویژه جنس‌های *باسیلوس* و *سودوموناس* است.

کلید واژگان: فنانترن، باکتری‌های تجزیه‌کننده، *باسیلوس*، *سودوموناس*، پالایشگاه آبادان.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
فرشید کفیل زاده؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹
Email:
Kafilzadeh@jia.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۶ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۳/۲۲ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/۳/۲۲

مقدمه

توسعه آلودگی‌ها خطرات بسیاری از جمله سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی، برای انسان و سایر موجودات زنده به دنبال دارد. در عصر حاضر آلودگی با ترکیبات هیدروکربنی رو به افزایش بوده و سلامتی موجودات را تهدید می‌کند. برخی از ترکیبات هیدروکربنی آلوده‌کننده، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) هستند (۱، ۲).

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)، ترکیبات آلی غیر قطبی که از ۲ یا تعداد بیشتری حلقه بنزن در هم ادغام شده، ساخته و به‌صورت ساختارهای خطی، گوشه‌دار یا خوشه‌ای، منظم شده‌اند. PAH ها برطبق تعداد حلقه‌ها، نوع حلقه و ترکیب اتم‌هایشان طبقه‌بندی می‌شوند. PAH های با وزن مولکولی کم (LMW)، ۲ یا ۳ حلقهٔ آروماتیک و PAHs با وزن ملکولی بالا (HMW) حاوی بیش از ۳ حلقه می‌باشند. در یک تعریف، PAH ها تنها اتم‌های کربن و هیدروژن در ساختارشان دارند، اما بعضی از کربن‌های آنها می‌تواند به‌وسیلهٔ نیتروژن، سولفور و اکسیژن جانشین شود و در نتیجه هیدروکربن‌های هتروآروماتیک چندحلقه‌ای از قبیل کاربازول وبنزوفوران ایجاد شود. امروزه می‌دانیم که PAHs LMW واقعاً سمّی وHMW ژنوتوکسیک می‌باشند (۳). هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای یکی از شایع‌ترین آلاینده‌های موجود در خاک می‌باشند. منابع PAH آلوده‌کنندهٔ خاک، شامل منابع آنتروپوژنیک (Antropogenic) از قبیل جایگاه‌های قدیمی تولید گاز، نشت تانک‌های ذخیره‌کنندهٔ زیرزمینی، جایگاه‌های انبار چوب و فرآیندهای رایج صنعتی است (۲، ٤، ٥ ،٦). آلودگی PAH همچنین می‌تواند به‌طور طبیعی در نتیجه جنگل‌سوزی و فعالیت انفجاری رخ دهد. این آلاینده‌های محیط زیست، در مجاورت مناطق شهری و مراکز صنعتی به میزان فراوان یافت می‌شوند و محصولات طبیعی از سوختن مواد آلی می‌باشند. PAH ها حلالیت نسبتاً کمی در آب دارند، اما بسیار لیپوفیلیک (چربی دوست) هستند. یکی از فاکتورهای اولیه که تجزیه PAH های با وزن مولکولی بالا را محدود می‌کند ناچیز بودن حلالیت آنها در آب است. این ترکیبات به‌وسیلهٔ استنشاق، ورود به معده و تماس پوستی در معرض قرار می‌گیرند و چون محلول در چربی هستندبه سرعت بوسیله روده و معده پستانداران جذب می‌شوند. متابولیسم PAH ها در بدن انسان ترکیبات اپوکسید با ویژگی‌های جهش‌زایی وسرطان‌زایی تولید می‌کند. سرطان شش، روده، کبد، پانکراس و پوست گزارش شده است (۱، ٦- ۸). فنانترن یکی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای بوده که در طبیعت انتشار گسترده ای دارد و در لیست آلاینده‌ترین ترکیبات بوسیله آژانس محیط زیست آمریکا (USEPA) قرار گرفته و باعث اثرات زیان‌آور زیستی می‌شود. این ماده یک هیدروکربن آروماتیک سه حلقه‌ای موجود در مشتقات زغال سنگ و سوخت‌های فسیلی می‌باشد که پوست انسان را به نور حساس می‌کند، مقدار کمی آلرژی ایجاد کرده و در سیستم‌های باکتریایی تحت شرایط مشخص جهش‌زایی می‌کند (۸، ۹). استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای پاک‌سازی آلودگی خاک و آب می‌تواند مؤثر و ارزان باشد و ایمنی محیطی را با پاک‌سازی مواد زاید فراهم کند. با تقویت زیستی، میکروارگانیسم‌ها علاوه بر اینکه قادر به متابولیزه کردن مواد آلوده‌کننده هستند، به‌عنوان یک تکنولوژی تجزیه‌ای در بالا بردن سرعت تجزیه در خاک‌ها و رسوباتی که اخیراً آلوده شده‌اند، استفاده می‌شود (۳). از آنجایی که تجزیه‌ی PAH ها بوسیله میکروارگانیسم‌ها ثابت شده، دگرگونی زیستی میکروب‌ها فرآیند محیطی اصلی و مؤثر در سرنوشت این آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های خاکی و آبزی می‌باشد (۹، ۱۰). تعدادی از گونه‌های باکتریایی که PAHs (از جمله فنانترن) را تجزیه می‌کنند و از خاک و رسوبات آلوده جداسازی شده‌اند، سودوموناس ائروجینوزا، سودوموناس فلئورسنس، مایکوباکتریوم اسپی، هموفیلوس اسپی، رودوکوکوس اسپی و پانئی باسیلوس

اسپی می‌باشند (۲). برخی از تحقیقات انجام‌شده در پدیدهٔ تجزیه باکتریایی فنانترن عبارتند از: جداسازی باکتری‌های جدید تجزیه کنندهٔ فنانترن از آب دریا و اثر فاکتورهای فیزیکی روی تجزیه این ترکیب توسط پینیاکونگ (Pinyakong) و همکارانش در سال ۲۰۱۲، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک سه حلقه‌ای (آنتراسن و فنانترن) توسط عبدالسلام (Abdesalam) و همکاران در سال ۲۰۰۹، باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای در خاک آلوده به نفت سنگین توسط بایومی (Bayoumi)در سال ۲۰۰۹، جداسازی و ویژگی‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (از جمله فنانترن) از خاک‌های متفاوت قطر توسط الثانی (Al-Thani)و همکارانش در سال ۲۰۰۹، جداسازی و بررسی خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنانترن از خاک آلوده به نفت خام توسط کورال(Coral) و همکارش دز سال ۲۰۰۵، همچنین در سال ۱۹۹۸، برادسکو (Beradesco) تجزیهٔ فنانترن توسط باکتری‌های *سودوموناس* و *ویبریومایکوباکتریوم* را مورد بررسی قرار داده است. استوارتز (Schwartz) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی خاک‌های منطقه‌ی Yolo اقدام به بررسی تأثیر متیلن‌کلراید بر روی میزان انحلال و تجزیه فنانترن توسط باکتری‌ها نمودند (۱،۳، ۸، ۹، ۱۱-۱۳). هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کنندهٔ فنانترن در خاک اطراف پالایشگاه آبادان، بررسی سینتیک رشد آنها و معرفی باکتری‌های بومی مقاوم به فنانترن در پالایشگاه، جهت به-کارگیری در پاک‌سازی آلودهکننده های خاک می‌باشد.

روش بررسی

الف) نمونه‌برداری: برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنانترن، نمونه‌های خاک آلوده به نفت از اطراف پالایشگاه آبادان که یکی از مهم‌ترین مناطق نفتی ایران و یک مرکز پالایش و نمک‌زدایی نفت خام است جمع‌آوری شد (۸). ۲۷ نمونهٔ خاک از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی‌متری سطح زمین از شمال (ایستگاه A)، جنوب (ایستگاه B) و مشرق (ایستگاه C) پالایشگاه که آلودگی نفتی بالایی نسبت به سایر مناطق داشتند با قاشقک استریل جمع‌آوری وسپس این نمونه‌ها در ظرف‌های پلاستیکی استریل دردار ریخته شد و در محفظهٔ حاوی یخ برای انجام آزمایش‌های تجزیه زیستی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند (۱٤). آزمایش‌های میکروبی حداکثر ۲٤ تا ٤۸ ساعت بعد از نمونه‌گیری انجام شد (٦). در این تحقیق از مواد آزمایشگاهی (محیط های کشت و فنانترن) ساخت شرکت مرک (Merck) آلمان استفاده گردید.

ب) شمارش باکتری‌ها: پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، شمارش باکتری‌ها با استفاده از روش Total Viable Plate Count (TVPC) صورت گرفت. در این روش از نمونه‌های خاک بوسیلهٔ سرم فیزیولوژی رقت $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ تهیه و در محیط نوترینت آگار حاوی ۰/۵ گرم بر لیتر فنانترن و محیط نوترینت آگار بدون فنانترن کشت سطحی (Surfase Plate) داده شد. سپس پلیت‌های کشت داده‌شده به مدت ٤۸ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. پس از مدت زمان گرمخانه گذاری تعداد کلنی‌ها در محیط‌های کشت حاوی فنانترن و بدون فنانترن شمارش گردید (۱۵).

ج) روش جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن: برای جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های خاک، ۵ گرم از خاک هر ایستگاه، که حاوی انواع باکتری‌های سازگار با محیط نفتی بود، به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰rpm ، سانتریفیوژ گردید. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی جمع‌آوری و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه معدنی (MSM) افزوده شد (۸). بعد از یک هفته و با مشاهدهٔ کدورت در محیط کشت (برای تجزیه بیشتر فنانترن توسط میکروارگانیسم‌ها و افزایش رشد آنها)، ۱۰درصد از آن به محیط کشت جدید پایه معدنی تلقیح شد. عمل تجدید کشت به‌مدت ۳ هفته، با شرایط مذکور ادامه یافت

(۱۱). سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاصل از آخرین غنی‌سازی به روش پورپلیت بر سطح محیط کشت جامد MSM، کشت داده شد. برای خالص‌سازی باکتری‌ها، کلنی‌هایی که از نظر ظاهری متفاوت بودند، به‌صورت متوالی بر روی محیط کشت جامد پایهٔ معدنی حاوی فنانترن به روش کشت خطی، کشت داده شد (۸).

د) شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنانترن: اولین مشخصه‌ی شناسایی، ظاهر باکتری‌هاست. از این‌رو خصوصیات ظاهری کلنی باکتری‌ها از لحاظ اندازه، شکل، رنگ، لبه، سطح وشفافیت مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی دقیق‌تر از آزمایشات معمول میکروبیولوژی و آزمایش‌های تشخیص بیوشیمیایی بر اساس کتاب راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی از جمله: رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز، TSI، اوره، سیمون سیترات، ایندول، متیل رد، VP، ژلاتین، فنیل آلانین، اکسیداسیون و تخمیر، لایزین، رشد بر روی محیط مک‌کانی، احیای نیترات و حرکت استفاده شد (۱٦).

ه) بررسی توانایی تجزیه فنانترن توسط باکتری‌ها: در این روش معیار انتخاب باکتری بر اساس میزان کدورت حاصل از رشد آنها می‌باشد. به این معنا که هر چه محیط کدرتر باشد، میزان رشد باکتری‌ها نیز بیشتر بوده است. از این رو با مقایسه لوله‌های حاوی باکتری با استاندارد ۰/۵ مک فارلند، حدود $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایهٔ معدنی تلقیح شد و پس از ۳ روز کدورت محیط‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین کدورت محیط‌ها به‌صورت چشمی نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ثبت گردید (۱۷).

و) ارزیابی رشد باکتری‌های جداشده در غلظت‌های مختلف فنانترن بوسیله جذب نوری: در این روش بهترین سویه‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن از بین باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن با مطالعه جذب نوری آن‌ها جداسازی شدند. به این‌صورت که در ارلن‌های جداگانه به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت فنانترن براث (با غلظت‌های متفاوت فنانترن) ریخته شد. سپس غلظتی معادل استاندارد نیم مک فارلند از رشد باکتری‌ها تهیه و ۱/۵ ml از این غلظت به محیط‌های مربوطه جهت بررسی سینتیک رشد اضافه گردید. برای هر کدام از باکتری‌ها ٤ ارلن در نظر گرفته شد و در هر ارلن غلظت‌های ۰/۵ تا ۰/۸ گرم بر لیتر فنانترن اضافه گردید. برای هر باکتری یک ارلن به صورت شاهد در نظر گرفته شد. در محیط شاهد تنها محیط کشت پایه بدون فنانترن با سویه مشخص وجود داشت. محیط ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس جذب آنها در ٦۰۰ نانومتر خوانده شد. این کار به‌مدت ۱ هفته و هر ۱۲ ساعت یک‌بار انجام شد (۸).

ز) تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها و از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری تجزیه واریانس (ANOVA) و دانکن (Duncan) برای تحلیل داده‌ها استفاده گردید. مرز معناداری در سطح ۵% قرار داده شد.

یافته‌ها

بین ایستگاه‌ها از لحاظ باکتری‌های شمارش‌شده تفاوت وجود داشت. بیشترین شمارش باکتری‌ها در ایستگاه C با میزان ۰/۱۰±۸/۰۸۳ و کمترین شمارش مربوط به ایستگاه B با میزان ۰/۱۰±۵/٤٤۲ بوده است. کل ایستگاه‌ها با یکدیگر تفاوت معناداری را در سطح ۵درصد آزمون دانکن نشان می‌دهد (نمودار۱).

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن: ۸۰درصد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ جداشده گرم مثبت و ۲۰درصد گرم منفی بودند، در نتیجه درصد فراوانی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود و تفاوت معناداری در سطح ۵درصد داشتند. در این تحقیق، بترتیب از نظر فراوانی باکتری‌های *باسیلوس اسپی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کورینه‌باکتریوم اسپی*، *میکروکوکوس لوتئوس* *واستافیلوکوکوس اپیدرمیس* جداسازی و شناسایی گردیدند. از بین باکتری‌های

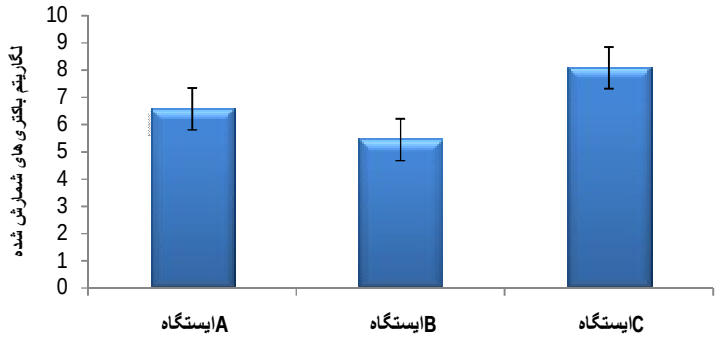
جداسازی‌شده بیشترین درصد فراوانی مربوط به جنس *باسیلوس* (۳٤/٦۲درصد) و کمترین درصد فراوانی مربوط به جنس استافیلوکوکوس اپیدرمیس (۳/۸۵درصد) بود (نمودار ۳ و ۲).

نتایج کدورت‌سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ٦۰۰ نانومتر، در محیط کشت‌های حاوی باکتری‌های مذکور، پس از سه روز تلقیح باکتری‌ها نشان داد که بیشترین میزان جذب نوری مربوط به محیط کشت‌های حاوی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس* به‌ترتیب ۰/۷۹۳ و ۰/٦٥٤ بود. نتایج کیفی بررسی‌های کدورت محیط کشت‌ها نشان داد که این دو باکتری نسبت به سایر باکتری‌های جداسازی‌شده، رشد و کدورت بسیار بالایی در محیط کشت مایع حاوی فنانترن داشتند. این باکتری‌ها رنگ محیط کشت را به‌ترتیب قهوه‌ای سبز و کدر کردند.

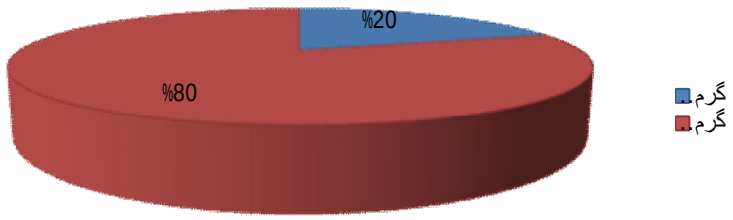
این دو گونه با توانایی بالا در تجزیهٔ فنانترن برای ادامه آزمایش‌های تجزیه زیستی انتخاب شدند (جدول۱).

بررسی سینتیک رشد: رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت‌های مختلف فنانترن نشان داد باکتری مذکور تا ۲٤ ساعت اول پس از تلقیح تقریباً رشد کمی داشته، ولی پس از آن وارد فاز لگاریتمی شد. در نتیجه، جذب نوری به تدریج افزایش یافته و منحنی رشد باکتری روند صعودی به‌خود گرفت (نمودار٤).

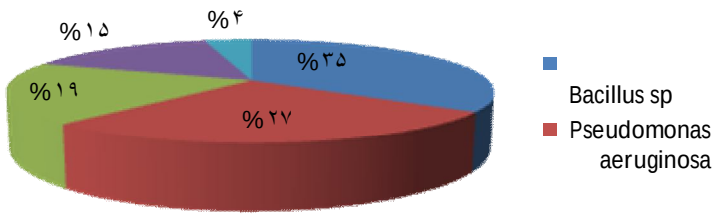
منحنی رشد باکتری *باسیلوس اسپی* در محیط کشت پایه معدنی حاوی غلظت‌های مختلف فنانترن نشان داد این باکتری تا ساعت ۲٤ از شروع انکوباسیون در فاز تأخیری قرار داشته و تقریباً رشد قابل توجهی در این محدوده‌ی زمانی صورت نگرفته است، ولی از آن ساعت به بعد رشد اولیه و تا ساعت ٤۸ رشد کمی داشته است (نمودار٥).



نمودار 1: لگاریتم باکتری‌های شمارش شده در ایستگاه‌های مختلف



نمودار2: درصد فراوانی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موجود در ایستگاه‌های مورد بررسی در تکرارهای مختلف

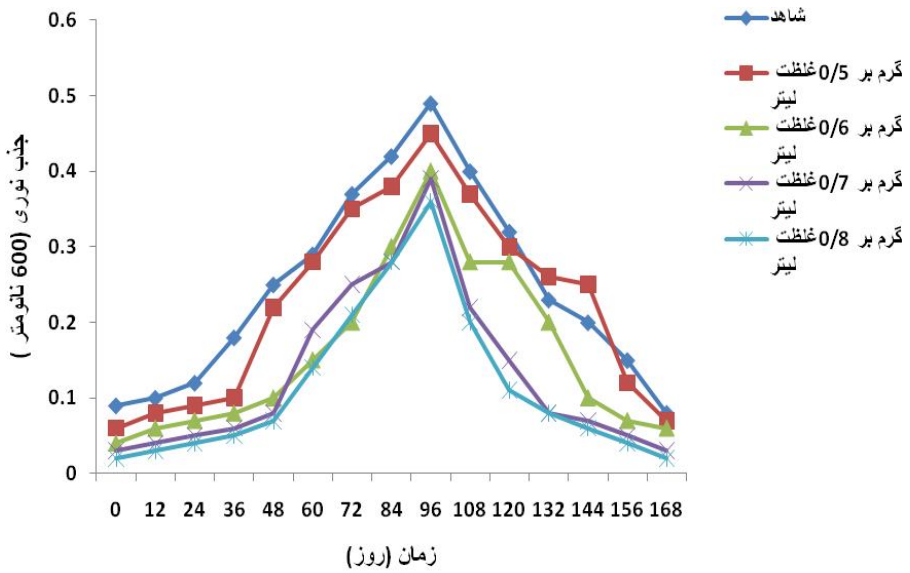


نمودار۳: درصد فراوانی باکتریایی جدا شده از ایستگاه‌های مختلف

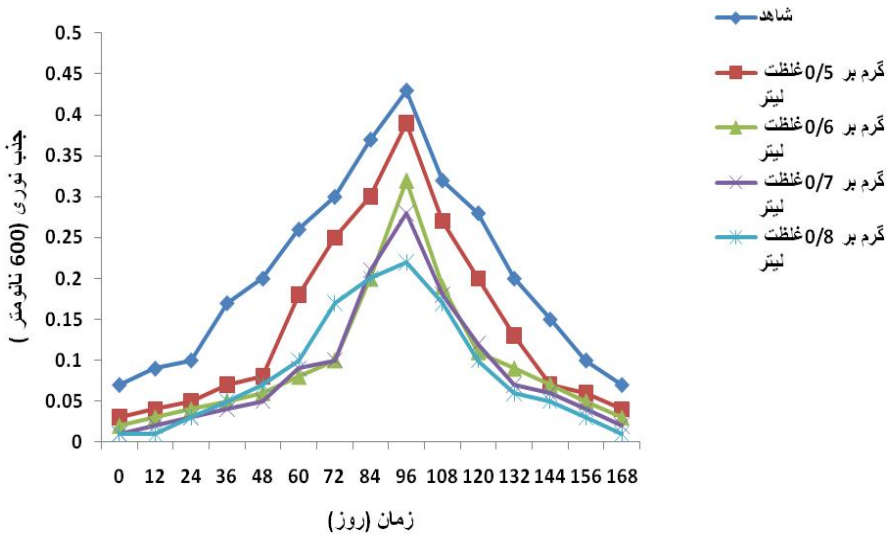
جدول ۱: زمان و میزان تقریبی رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی فنانترن در محیط پایه معدنی

نام باکتری	زمان(ساعت) ۲٤	۳۱	٤۸	٥٥	۷۲	رنگ محیط کشت پس از۷۲ ساعت	جذب نور (درصد)
شاهد						زرد شفاف	۰/۰۰
سودوموناس ائروژینوزا	++	++	+++			قهوه‌ای سبز	۰/۷۹۳
میکروکوکوس لوتئوس		+	+	++	+++	قهوه‌ای زرد	۰/۳۸۷
باسیلوس	+	++	+++			کدر	۰/٦٥٤
استافیلوکوکوس اپیدرمیس		+	+	+	+	کدر	۰/۲٤۱
کورینه باکتریوم		+	+	+	++	کدر	۰/۲۷۱

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



نمودار۴- منحنی رشد باکتری سودوموناس ائروجینوزا در غلظت‌های مختلف فنانترن به عنوان منبع کربنی



نمودار۵- منحنی رشد باکتری باسیلوس اسپی در غلظت‌های مختلف فنانترن به عنوان منبع کربنی

بحث

در تحقیق حاضر، ایستگاه C با میزان آلودگی بالا به ترکیبات نفتی شامل بیشترین تعداد و تنوع باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن بود. گیسلبرکت(Geiselbrecht) و همکاران در سال ۱۹۹٦ با شمارش باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ فنانترن و نفتالن موجود در رسوبات آلوده پوگت سوند دریافتند که در هر گرم از وزن خشک رسوبات مناطق نفتی 10^4 تا 10^7 باکتری موجود می‌باشد، در حالی‌که در هر گرم از وزن خشک رسوبات یک سایت غیر آلوده 10^3 تا 10^4 باکتری وجود داشت (۱۸). اکثر جدایه‌ها در پژوهش جاری، باکتری‌های گرم مثبت شامل *باسیلوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *کورینه باکتریوم* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* بود. یک گونه باکتری گرم منفی به نام *سودوموناس ائروجینوزا* نیز از خاک آلودهٔ نفتی در اطراف پالایشگاه آبادان جداسازی شد. ایلوری (Ilori)و همکاران در سال۲۰۰۰، ٤ گونه باکتری *میکروکوکوس لوتئوس*، *باسیلوس سابتیلیس*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *آلکالیجنز یوتروفوس* را از خاک‌های آلودهٔ نفتی جداسازی و خالص‌سازی کردند (۱۹).

نوری و همکاران در سال ۲۰۰٦، باکتری‌های گرم مثبت تجزیه‌کننده فنانترن آب‌های بنادر امیر آباد و نوشهر را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که از ۱٦ نمونه باکترهای گرم مثبت تجزیه‌کننده فنانترن جداسازی شده، ۹ نمونه متعلق به جنس *باسیلوس* و۷ نمونه *کورینه باکتریوم* بوده است (۲۰). در تحقیق حاضر نیز باکتری باسیلوس به تعداد فراوانی جدا شدند. بایومی و همکارانش در سال ۲۰۱۰، ۸ باکتری *میکروکوکوس واریانس*، *باسیلوس* ، *سابتیلیس*، *سودوموناس آلکالیجنز*، *باسیلوس لیچنی فورمیس*، *باسیلوس لتروسپوروس* *سودوموناس پوتیدا*، *باسیلوس فیرموس* و *اسینتوباکتر* را بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جداسازی کردند و از بین این باکتری‌ها، *باسیوس سابتیلیس* و *باسیلوس لتروسپوروس* به‌عنوان قوی‌ترین گونه‌ها انتخاب شدند که از قدرت رشد بالایی برخوردار بودند. در تحقیق حاضر نیز از بین باکتری‌های جداسازی‌شده، سودوموناس ائروجینوزا و باسیلوس به‌عنوان قوی‌ترین گونه‌ها شناسایی و بیشترین رشد را در حضور فنانترن به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی داشتند (٤).

آیتکن(Aitken) و همکاران در سال ۱۹۹۸، با غنی‌سازی جمعیت باکتریایی خاک‌های ۷ ایستگاه آلوده به ترکیبات آروماتیک در محیط کشت حاوی فنانترن به-عنوان تنها منبع کربن، ۱۱ گونه مقاوم را جداسازی و

خالص‌سازی کردند. بررسی‌ها نشان داد که حداقل ۳ گونه، متعلق به جنس *سودوموناس* و بقیه متعلق به جنس‌های *آکروباکتریوم*، *باسیلوس*، *بورخولدریا* و *اسفنگوموناس* بودند. طبق نتایج باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس در حضور فنانترن قادر به رشد بودند. برخی از باکتری‌های جداسازی شده توسط آیتکن و همکارانش مشابه با باکتری‌های جداسازی شده در تحقیق حاضر می‌باشد و شامل *باسیلوس* و *سودوموناس* است که از قدرت رشد بالایی برخوردار بودند (۲۱). پینیاکونگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲، دو گونه جدید تجزیه‌کننده فنانترن به نام‌های PHPY و SK را از آب دریا جداسازی کردند. آنالیز فیلوژنیک بازهای 16SrDNA نشان داد که گونه‌های مذکور ممکن است به‌ترتیب جنس‌های جدید خانواده اسفنگوموناسیاسه و رودوباکتریاسه باشند (۹). لیز و همکارانش در سال ۲۰۱۱ سه باکتری را که قادر به تجزیه PAH های سه، چهار و پنج حلقه‌ای بودند از ترکیبات آلوده به PAH جداسازی و بر اساس آنالیز 16SrRNA سه باکتری جداسازی‌شده را به‌عنوان *مایکوباکتریوم اسپی* شناسایی کردند. همچنین نشان دادند *مایکوباکتریوم اسپی* به‌سرعت فنانترن و پیرن را تجزیه کرد اما قادر به تجزیه فلورن یا بنزوa پیرن نبود (۵). استالی در سال ۲۰۰۱ گونه $P_{٤٤}$ P-۲ را از رسوبات دریایی آلوده نفتی جداسازی کردند. آزمایش‌های رشد نشان داد که این باکتری قادر است چندین ترکیب آروماتیک دو و سه حلقه‌ای مانند نفتالن ۲متیل و فنانترن را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار دهد. شناسایی‌های ژنتیکی و مورفولوژیک مشخص کرد که این‌گونه متعلق به گونه‌های جدید ازجنس *ویبریو* به نام *ویبریوسیکلوتروفیکوس* می‌باشد (۲۲). همچنین خالیا و همکاران در سال ۲۰۰٤ برای ارزیابی تجزیه زیستی ۳ ترکیب از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (فنانترن، پایرن وفلورانتن)، گونه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده را از رسوبات ۳ ایستگاه آلوده نفتی دریای اگزایمن وسترن، جداسازی کردند. گونه‌های فوق متعلق به جنس‌های *آئروباکتریوم*، *رودوکوکوس* و *آرتروباکتر* بودند (۲۳). هیچ‌کدام از این سویه‌ها در منطقه‌ی پالایشگاه آبادان جداسازی نشدند. کارول در سال ۲۰۰۵، ۵۰ گونه باکتری تجزیه‌کننده فنانترن را که همگی متعلق به جنس *سودوموناس* بودند از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی پالایشگاه مرسین در ترکیه جداسازی و خالص‌سازی کردند که بهترین رشد را در محیط MM9 حاوی فنانترن داشتند (۸). در تحقیق حاضر نیز باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی و شناسایی شد که بهترین رشد را در محیط MSM حاوی فنانترن داشت. همچنین سایر پژوهش‌گران از قبیل Beradesco و همکارانش در سال ۱۹۹۸، سپاکا و همکاران در سال ۲۰۰۱، سوتی در سال ۲۰۰۷، ردا در سال ۲۰۰۹ و عبدالسلام و همکاران در سال ۲۰۰۹، قابلیت تجزیه فنانترن توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی را به اثبات رسانیدند (۱، ۳، ۱۰، ۱۲، ٢٤). طی آزمایشات کدورت‌سنجی مشخص شد در محیط کشت حاوی باکتری‌های باسیلوس، رنگ محیط کشت از زرد شفاف به کدر و محیط کشت حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به قهوه‌ای سبز تغییر کرده بود و فاز تأخیری در منحنی رشد گونه‌ها بسیار کوتاه بود. نامچی و همکارانش در سال ۲۰۰٦ با انجام کدورت‌سنجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نشان دادند که پس از سه روز از شروع انکوباسیون، رنگ محیط کشت حاوی *سودوموناس آئروژینوزا* زرد متمایل به سبز و رنگ محیط کشت حاوی *بورخولدریا سپاسیا* زرد تیره شد (۱۷) الثانی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالن، فنانترن و آنتراسن را بر اساس تفاوت‌های فنوتیپی، مورفولوژیک و ویژگی‌های مولکولی از خاک‌های (آلوده به PAH) متفاوت قطر جاسازی کردند. از روی بخشی از توالی ژن 16SrDNA این باکتری‌ها، باکتری‌های *سودوموناس‌ژنی کولاتا* و *آکروباکتریوم زایلوسواکسیدانس* تعیین شدند. همچنین نشان دادند این باکتری‌ها از رشد بالایی در طول غربالگری به‌وسیله افزایش جذب نوری (OD600) برخوردارند، یک غلظت وابسته به رشد در

تمام ترکیبات PAH آزمایش گردید و تغییرات قابل مشاهده در رنگ محیط رشد در طول جداسازی آنها در انکوباسیون نیز دیده شد (۱۱).

روی (Roy) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند رشد باکتری‌ها باعث ایجاد یک کدورت آشکار در محیط کشت گردید، هیچ فاز تأخیری در منحنی رشد گونه‌ها دیده نشد و پس از یک مرحله رشد نمایی، رشد باکتری‌ها وارد مرحله ایستایی و سکون گردید (۲۵). از بین باکتری‌های جداسازی شده در تحقیق حاضر به‌ترتیب سودوموناس ائروژینوزا و باسیلوس به‌عنوان توانمندترین گونه‌ها در تجزیه فنانترن بودند. مقایسه منحنی رشد دو باکتری در غلظت‌های مختلف فنانترن نشان داد، باکتری سودوموناس آئروژینوزا پس از ساعت ۱۲ رشد خود را سریع‌تر از باکتری باسیلوس اسپی شروع کرده و جذب نوری آن در تمام ساعات آزمایش بیشتر از آن بوده است. رفتار باکتری‌های مذکور از لحاظ روند صعود و نزول منحنی رشد، مشابه یکدیگر است. فاز تأخیری باکتری باسیلوس اسپی بیشتر از باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده و تقریباً تا ساعت ۲٤ پس از تلقیح نیز ادامه داشته و فاز لگاریتمی آن‌ها تا ساعت ۹٦ ادامه داشته است، از این رو منحنی رشد حالت صعودی دارد. ولی پس از آن سرعت رشد باکتری‌ها کاهش داشته، میزان جذب نوری نیز کم شده و منحنی رشد روند نزولی به خود گرفته است. هر دو باکتری در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین رشد را در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر و کمترین رشد را در غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر داشته‌اند. ابراهیم در سال ۲۰۰۳ ، گونه *سودوموناس* را به‌عنوان توانمندترین گونه در تجزیه فنانترن جداسازی کرد و رشد آن را توسط اسپکتروفتومتر شیماتزو در ٦۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار داد. نتایج حاکی از سازگاری بالا و رشد خوب باکتری در مجاورت فنانترن به‌عنوان تنها منبع کربنی بود (۲٦).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد باکتری‌های تجزیه‌کننده فنانترن پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند و خاک اطراف پالایشگاه آبادان دارای تعداد زیادی از باکتری‌های مذکور است. از نظر فراوانی باسیلوس ولی از نظر قدرت تجزیه سودوموناس *آئروژینوزا*در رتبه اول قرار داشت.

قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معانت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم بدلیل حمایت های اجرایی اعلام می دارند.

منابع

1-Abd-Elsalam HE, Hafez EE, Hussain AA, Ali AG, El-Hanafy AA. Isolation and identification of three-rings poly aromatic hydrocarbons (anthracene and phenanthrene) degrading bacteria. American – Eurasian J Agric and Environ Sci 2009;5(1):31-8.
2-Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater 2009;169(1-3):1-15.
3-Bayoumi RA. Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. J Appl Sci Res 2009;5(2):197-211.
4-Bayoumi RA, Ashraf T, Hamd A. Optimization of bacterial biodegradation of toluene and phenol under different nutritional and environmental conditions. J Appl Sci Res 2010;6(8):1086-95.
5-Lease CWM, Bentham RH, Gaskin SE, Juhasz AL. Isolation and identification of pyrene mineralizing Mycobacterium spp. from contaminated and uncontaminated sources. Appl Environ Soil Sci 2011;2011:1-11.
6-Mesdaghinia AR, Nasseri S, Arbabi M, Rezaie S. Isolation of polycyclic aromatic hyodrocarbon –degrading bacteria associated with the petrolum contaminated soils in Iran. Proceeding of the international conference on Environmental science and Technology; 2005; Rhodes island, Greece. Global NEST. P. 984-990.
7-Lake JL, Norwood C, Dimock C, Bowen R. Origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. Geochim Cosmochim Acta 1979; 43:1847-54.

8-Coral GK, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene –degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Ann Microbiol 2005;55(4):255-9.
9-Pinyakong O, Tiangda K, Iwata K, Omori T. Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. Sci Asia 2012;38(1):36-43.
10-Supaka N, Pinphanichakarn P, Pattaragulwanit K, Thaniyavarn S, Omori T, Juntongjin K. Isolation and characterization of a phenanthrene degrading sphingomonas sp. Strain p2 and Its ability to degrade Fluoranthene and pyrene via cometabolism. Sci Asia 2001;27(1):21-8.
11-Al-Thani RF, Abd-El-Haleem DAM, Al-Shammri M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. Afr J Microbiol Res 2009;3(11) 761-6.
12-Berardesco G, Dyhrman S, Gallagher E, Shiaris MP. Spatial and temporal variation of phenanthrene –degrading bacteria in intertidal sediments. Appl Environ Microbiol 1998;64(7):2560-5.
13-Schwartz E, Trinh SV, Scow KM. Impact of methylen chloride on microorganisms and phenanthrene mineralization in soil. J Environ Qual 2002;31(1):144-9.
14-Mashreghi M, Marialigeti K. Characterization of bacteria degrading petroleum derivatives isolated from contaminated soil and water. J Sci IR Iran 2005;16(4):317-20.
15-Udeani TKC, Obroh AA, Okwuosa CN, Achukwu PU, Azubike N. Isolation of bacteria from mechanic workshops' soil environment contaminated with used engine oil. Afr J Biotechnol 2009;8(22) 6301-3.
16-Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed.New York: Spriger; 2005. P. 323-84.
17-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):181-90.
18-Geiselbrecht AD, Hedlund BP, Tichi MA, Staley JT. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degradation cycloclasticus strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound Cycloclasticus Strain. Appl Environ Icrobial 1998;64(12):4703-10.
19-Ilori MO, Amund OO, Ezeani CJ, Omoijiahina S, Adebusoye SA. Occurrence and growth potentials of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. Afr J Biotechnol 2006;5(7):542-5.
20-Nouri N, Amir Mozafari N, Safari R. [Comparing phenanthrene-degrading gram positive bacteria isolated from Noshahr and Amirabad coastal waters in terms of ecologic modificati- on]. J Environ Sci Tech 2006;8(2):101-8. [In Persian]
21-Aitken MD, Stringfellow WT, Nagel RD, Kazunga C, Chen SH. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Can J Microbiol 1998;44(8):743-52.
22-Hedlund BP, Staley JT. Vibrio cyclotrophicus sp.nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 2001;51(1):61-6.
23-Khalid M, Tianling Z, Huasheng H, Zhiming Y, Zhong H. Preliminary study on PAH degradation by bacteria from contaminated sediments in Xiamen Western Sea, Fujian, China. Chin J Oceanol Limnol 2004;22(4):431-5.
24-Sutiknowati LI. Hydrocarbon degrading bacteria: Isolation and Identification. Makara, Sains 2007;11(2):98-103.
25- Roy R, Ray R, Chowdhury R, Bhattacharya P. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by mixed culture isolated from oil contaminated soil-Abioprocess engineering study. Indian J Biotechnol 2007;6:107-13.
26-Ibrahim MK. Cloning and nucleotide sequence of catechol 2,3-dioxygenase gene from the naphthalene-degrading Pseudomonas Putida NA3. Int J Agric Biol 2003;5(4):423-7.

Isolation and identification of phenanthrene-degrading endemic bacteria from crud oil contaminated soils around Abadan refinery and evaluation of their growth

Farshid Kafilzadeh[1*], Seyedeh Zeynab Hoseyni[2], Hooshangh Jamali[3]

1- Associate Professor of Biology.
2- M.Sc. of Biology.
3- Assistant Professor of Biology.

1-Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2- Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
3- Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

**Corresponding author:*
Farshid Kafilzadeh; Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Tel: +989171140799
Email: Kafilzadeh@jia.ac.ir

Abstract

Introduction: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most common contaminants found in soil. PAHs exhibit a significant concern because of their toxicity, carcinogenic, teratogenic and mutagenic properties. Using microorganisms for cleaning the pollution of soil can be cheap, effective and can provide environmental immunity. The goal of this study is to isolate and identify phenanthrene degrading bacteria from contaminated crud oil soils around Abadan refinery and evaluation of their growth.

Methods and Materials: The soil samples were collected from three areas around Abadan refinery. The numbers of bacteria were counted at the nutrient agar culture with and without phenanthrene. Isolation of bacteria was done by culturing the samples on phenanthrene broth with basic mineral medium, and on phenanthrene agar medium. Then, the bacteria were determined by the biochemical diagnosis tests. Finally, with the cultivation of bacteria in concentrations of 0.5 to 0.8 g/l phenanthrene, the ability of phenanthrene biodegradation was measured.

Results: In this study, the maximum number of degrading bacteria was 8.083±0.10 at C station, and the minimum number of degrading bacteria was 5.442±0.10 at B station. In this study, the *Bacillus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corinebacterium* sp, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* bacteria was isolated and identified, respectively. *Pseudomonas* and *Bacillus* had the most growth and degradation in different concentrations of phenanthrene.

Conclusion: The results of this study showed that soil around Abadan refinery has lots of phenanthrene degrading bacteria, especially *Bacillus* and *Pseudomonas*.

Keywords: Phenanthrene, Degrading Bacteria, *Bacillus*, *Pseudomonas*, Abadan Refinery.

Received: Feb 25, 2012 **Revised: June 11, 2012** **Accepted: June 11, 2012**