مجله سلامت و بهداشت اردبیل

دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۷ تا ۱۷

جداسازی باکتری های تجزیه کننده کریزن از خاک‌های منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس (عسلویه) و بررسی حذف کریزن توسط آن‌ها

فرشید کفیل زاده[1]*، نسیم صحت نژاد[2]، نورالدین گودرزیان[3]

[1] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران. [2] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران. [3] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه شیمی، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۷۱۱٤۰۷۹۹ فاکس: ۰۷۱۱ ۶۲۶۲۱۰۲ ایمیل: Kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به دلیل سمیت، سرطان زایی و نیز مقاومت نسبت به تجزیه باکتریایی، یکی از عوامل تهدید کننده محیط زیست محسوب می‌شوند. کریزن یک ترکیب آروماتیک ٤ حلقه ای است. در این تحقیق باکتریهای تجزیه کننده کریزن از خاکهای آلوده به نفت منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس جداسازی شدند و سپس تجزیه کریزن در شرایط آزمایشگاهی و تاثیر تغییرات غلظت آن بر رشد باکتری ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: ابتدا نمونه ها را پس از صاف کردن، در محیط های حاوی ترکیبات معدنی و ماده هیدروکربنی کریزن کشت داده و در ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ١٤ روز انکوبه شدند. پس از جدا سازی باکتری ها، با استفاده از تست های مرسوم میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی آن ها انجام گردید. جهت بررسی میزان رشد باکتری های تجزیه کننده، دانسیته نوری ($OD_{۶۰۰}$) آن ها در غلظت های ۰/۱ تا ۰/٤ گرم بر لیتر کریزن مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی، میزان تجزیه و حذف کریزن توسط باکتری های جداشده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: ٤ باکتری سودوموناس پوتیدا، گونه‌های مایکوباکتریم، میکروکوکوس واریانس و باسیلوس کوآگولانس جداسازی و شناسایی گردیدند. باکتری سودوموناس پوتیدا به عنوان قوی ترین باکتری در تجزیه کریزن شناخته شد. به طوری که در حداقل زمان ممکن رشد نمود و دانسیته نوری آن در تمام غلظت های مورد آزمایش از بقیه باکتری ها بیشتر بدست آمد. این باکتری توانست در طی ۱۰ روز ۹۵ درصد از کریزن با غلظت اولیه ۱/. گرم بر لیتر را تجزیه و حذف نماید. گونه‌های مایکوباکتریم در رده دوم از نظر قدرت تجزیه کریزن قرار گرفت. ضعیف ترین باکتری تجزیه‌کننده کریزن، باسیلوس کوآگولانس تعیین گردید. این باکتری پس از ۱۰ روز ٤۲ درصد از کریزن را تجزیه نمود.

نتیجه گیری: سودوموناس پوتیدا بیشترین دانسیته نوری و تجزیه کریزن را به خود اختصاص داد. این باکتری به دلایل مختلف از جمله حضور در شرایط محیطی مختلف و داشتن آنزیم های تجزیه کننده، توانایی حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را دارد.

کلمات کلیدی: کریزن، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای، اصلاح زیستی، سودوموناس پوتیدا، گونه‌های مایکوباکتریوم

دریافت: ۹۱/۱/۲۹ **پذیرش:** ۹۱/۷/۱۱

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

مقدمه

منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس در سال ۱۳۷۷ به منظور بهره برداری از منابع نفت و گاز حوزه پارس جنوبی و انجام فعالیت های اقتصادی در زمینه نفت و گاز تأسیس شده است.

این منطقه در حاشیه شمالی خلیج فارس و در حدود ۳۰۰ کیلومتری بندر بوشهر و حدود ۱۰۰ کیلومتری حوزه گازی پارس جنوبی واقع شده است. اگر چه این منطقه توانسته است ثروت ملی را افزایش دهد ولی همگام با آن، آلودگی محیط زیست و کاهش کیفیت محیطی مناسب را به همراه داشته است.

وجود پالایشگاه های پتروشیمی، گاز، منابع نفتی و گازوئیلی، آلودگی های منطقه را دو چندان نموده که از طریق خاک، آب، هوا وارد حوزه منطقه شده و روند آلودگی را افزایش داده است.

در بین آلاینده های ورودی، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای[1] از اهمیت خاصی برخوردارند که جزء آلاینده های نفتی بوده و در ساختمان آنها حلقه های بنزنی به کار رفته است. ۲ نوع هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای در طبیعت وجود دارد:

۱- هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با وزن مولکولی پایین شامل: نفتالن، آسنفتیلن، آسنفتن، فلورن، آنتراسن، فنانترن.

۲- هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای باوزن مولکولی بالا شامل : فلورانتن، کریزن، پیرن، بنزوفلورانتن [۲-۱].

آکادمی ملی علوم[2] ۸۰-۴۰ مورد از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه ای را شناسایی کرده که به شدت سمی و موتاژنیک هستند در حالیکه ۱۰ مورد دیگر به طور ضعیف جزء سرطانزاها و موتاژنها به شمار می‌روند [۳].

بر طبق آزمایشاتی که توسط پژوهشگران انجام شده افراد سیگاری نسبت به افراد عادی بیشتر در معرض مستقیم PAH و به دنبال آن شرایط ابتلا به سرطان مری هستند [٤].

کریزن یک هیدروکربن آروماتیک ٤ حلقه‌ای می‌باشد. از این ماده در تهیه آهن، آلومینیم و فولاد استفاده فراوانی شده و آژانس بین المللی آمریکا آن را جزء مواد سمی آلاینده گزارش نموده است. نیمه عمر آن در جو ۱/۲۵ ساعت و به عنوان نتیجه واکنش با رادیکالهای فتو شیمیایی تولید هیدروکسیل می‌کند و از طریق هوای آلوده به خصوص دود سیگار در معرض انسان قرار می گیرد [۶-۵]. یکی از راه های کاهش این نوع آلاینده ها، اصلاح زیستی[3] است، به طوری که از میکروارگانیسم ها برای تجزیه آلاینده‌ها استفاده می‌شود. در تجزیه ترکیبات آروماتیک توسط میکروارگانیسم ها، مجموعه عوامل بیولوژیک (نظیر نوع موجود و تعداد ژن) و غیر بیولوژیک (نظیر منبع نیتروژن و فسفر، pH، اکسیژن و سایر مواد محرک رشد) دخالت دارند [۸-۷].

گوته[4] و همکاران در سال ۲۰۱۰ اصلاح زیستی کریزن را در خاک های آلوده به نفت مورد مطالعه قرار دادند. در بین ۲۱ سویه باکتریایی جداشده، آکروموباکتر اینسولیتوس[5] موثرترین سویه در تجزیه کریزن شناخته شد [۹].

دوته[6] و همکاران در سال ۲۰۱۰ تجزیه زیستی کریزن را به وسیله سویه های باکتریایی جدا شده از لجن نفتی مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس آزمایش های مورفولوژیک و بیوشیمیایی، باکتریها به عنوان گونه‌های باسیلوس[7] و گونه‌های سودوموناس[8] شناسایی شدند [۱۰].

[1] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH_S)
[2] National Academey of Sciences

[3] Bioremediation
[4] Gutte
[5] *Achromobacter insolitus*
[6] Dhote
[7] *Bacillus* sp
[8] *Pseudomonas* sp

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

ایگوو-ازیکپه[1] و همکاران در سال ۲۰۰۹ تجزیه کریزن را به وسیله باکتری آلکالی ژنز فیکالیس[2] مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق غلظت های ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کریزن پس از ۷ روز به ترتیب به ۱۷/٤، ۲۷/۲ و ۲۸/۷ میلی گرم بر لیتر کاهش یافت [۱۱].

نایاک[3] و همکاران در سال ۲۰۱۱ مسیر تجزیه کریزن کریزن را به وسیله گونه‌های سودوزانتوموناس[4] مورد مطالعه قرار دادند. بر طبق نتایج آن ها، کریزن از طریق مسیر هیدروکسی فنانترونیک اسید، ۱-هیدروکسی-۲-نفتوئیک اسید، سالیسیلیک اسید و کاتکول تجزیه می شود. سپس کاتکول به وسیله آنزیم کاتکول-۲،۱-دی اکسیژناز به سیس، سیس-موکونیک اسید و سرانجام واسطه های چرخه کربس تبدیل می‌گردد [۱۲].

با جداسازی باکتریهای تجزیه کننده مواد آلاینده و ترکیبات نفتی و تهیه بانک میکروبی و استفاده از آنها در مواقع بحرانی می توان حرکتی مهم در جهت کاهش آلاینده های محیطی و ایجاد یک اکوسیستم سالم انجام داد [۱۳]. هدف از این تحقیق جداسازی سویه های پرقدرت در تجزیه کریزن و تعیین منحنی رشد این باکتری ها در حضور آن و همچنین میزان تجزیه کریزن توسط باکتری ها ی جدا شده می باشد.

روش کار

الف) نمونه برداری

در این تحقیق آزمایشگاهی، جامعه مورد بررسی، خاکهای منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس واقع در منطقه عسلویه است (خاکهای آلوده به نفت کمپ ۱). نمونه برداری از ۳ ایستگاه انجام شد. به منظور جمع آوری نمونه، از ظروف درب دار شیشه ای و استریل شده استفاده و نمونه‌ها کمتر از ٤۸ ساعت در ٤ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل گردیدند. بلافاصله عملیات مربوط به جداسازی گونه های باکتریایی ازنمونه ها آغاز شد [١٤].

ب) جدا سازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده کریزن

کشت نمونه های خاک در محیط معدنی حاوی کریزن به عنوان تنها منبع کربن انجام گردید. سپس بر روی هم زن با دور ۱۲۰ rpmو در شرایط تاریکی در ۳۲ درجه سانتی گرادبه مدت ١٤ روز قرار داده شد. در صورت مشاهده کدورت در هر یک از لوله‌های کشت داده شده، با انتقال مقدار مناسبی از لوله‌های حاوی نمونه بر سطح پلیت کریزن آگار، باکتری‌های واقعی تجزیه کننده کریزن جدا گردیدند [۶]. برای شناسایی باکتری ها از آزمایش های معمول میکروبیولوژیک و تشخیص بیوشیمیایی بر اساس کتاب راهنمای برگی از جمله: رنگ آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز، TSI، اوره، سیمون سیترات، ایندول، متیل رد، VP، ژلاتین، فنیل آلانین، اکسیداسیون و تخمیر، لایزین، رشد بر روی محیط مک کانکی، احیاءِ نیترات و حرکت استفاده شد[۱۵].

ج) انتخاب سویه های پر قدرت از میان کلیه سویه‌های جدا شده

پس از جدا نمودن سویه های باکتریایی، به منظور غربال بهترین و قوی ترین سویه ها، آن ها را در محیط کشت پایه معدنی همراه ۲cc/. از محلول ۰/۱ گرم بر لیتر کریزن در استون، کشت داده و باکتری‌هایی که در حداقل زمان ممکن شروع به رشد نمودند به عنوان سویه های پر قدرت در تجزیه کریزن انتخاب شدند.

د) سینتیک رشد

به منظور تعیین منحنی رشد، به تعداد هر باکتری ٤ لوله از محیط حاوی پایه معدنی در نظر گرفته شد. به هر لوله ۰/۲ml از غلظت های مختلف محلول کریزن (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/٤ گرم بر لیتر در استن)

[1] Igwo-Ezikpe
[2] *Alcaligenes faecalis*
[3] Nayak
[4] *Pseudoxanthomonas* sp

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

اضافه گردید. سپس بر روی هم زن با دور ۱۲۰ rpm و در درجه حرارت ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰روز گرماگذاری شدند. در نهایت به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر دانسیته نوری ($OD_{۶۰۰}$) لوله ها ناشی از کدورت باکتری ها اندازه گیری گردید [۱۶].

هـ) آنالیز کروماتوگرافی

ابتدا هر باکتری را جدا گانه در ۱۰ میلی لیتر نرمال سیلینگ یا محیط نوترینت براث کشت داده و به مدت یک روز در ۳۲ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. سپس ml ۵ از آن در ml ۹۰ از محیط حاوی پایه معدنی به مدت یک هفته الی ۱۰ روز گرماگذاری و پس از گذشت این مدت آن را سانتریفیوژ کرده تا رسوب حاصل از آن جدا شود. رسوب را جدا و به آن n-هگزان اضافه و مخلوط کرده تا ماده کریزن باقی مانده در حلال حل شود. سپس آن را ثابت نگه داشته تا دو فاز از هم جدا شوند. فاز بالایی برای آزمایش با دستگاه کروماتوگرافی (HPLC) جداگردید [۱۷].

این دستگاه متعلق به شرکت Knuer شامل پمپ K1001 دکتور UV مدل K2501 و ستون C18 می‌باشد.

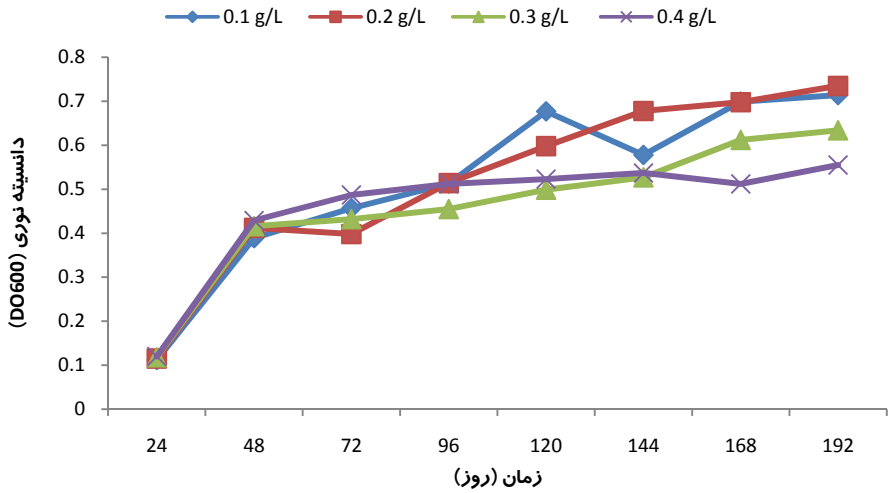
یافته ها

بر پایه آزمایش های میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی انجام شده در این تحقیق، ٤ باکتری سودوموناس پوتیدا[1]، گونه‌های مایکوباکتریوم[2]، میکروکوکوس واریانس[3] و باسیلوس کوآگولانس[4] شناسایی گردیدند. از بین ٤ نوع باکتری جداسازی شده، سودوموناس پوتیدا و گونه‌های مایکوباکتریم به ترتیب به عنوان پر قدرت ترین سویه ها شناخته شدند که در کمترین زمان ممکن شروع به رشد نمودند. با توجه به نمودار ۱ مشاهده می‌گردد، رشد باکتری سودوموناس پوتیدا در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر، در ساعت ۱۲۰ به اوج خود رسیده و سپس تا ساعت ١٤٤ کاهش می یابد و بعد از آن مجدداً رشد این باکتری روند افزایشی دارد.

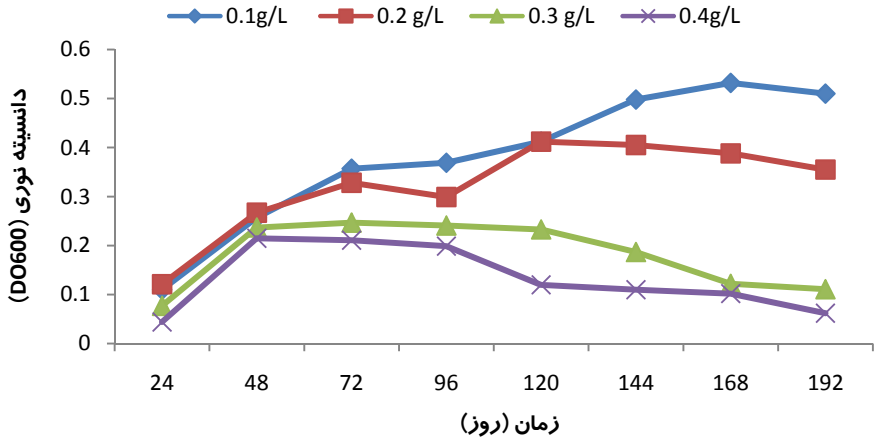
در غلظت ۰/۲ گرم بر لیتر کریزن، پس از ساعت ۷۲ رشد باکتری پیوسته در حال افزایش است. در غلظت ۰/۳ گرم بر لیتر کریزن، با گذشت زمان میزان رشد این باکتری افزایش می یابد و بالاخره در غلظت ٠/٤ گرم بر لیتر کریزن، رشد باکتری تا ساعت ٤٨ افزایش یافته و پس از آن رشد تقریباً ثابت مانده است. در مجموع نتایج سینتیک رشد برای این باکتری نشان می دهد که به جز غلظت ٠/٤ گرم بر لیتر کریزن، در بقیه غلظت ها با گذشت زمان رشد نسبتاً افزایش می یابد. با توجه به نمودار سینتیک رشد گونه‌های مایکوباکتریم (نمودار۲)، مشاهده می‌گردد در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر کریزن در ساعت ۱۹۲ رشد باکتری به اوج خود رسیده و با گذشت زمان رشد باکتری افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۲ گرم بر لیتر کریزن، رشد این باکتری در ساعات مختلف نوسانات زیادی (افزایش و کاهش) از خود نشان داد. در غلظت های ۰/۳ و ٠/٤ گرم بر لیتر کریزن، رشد این باکتری ابتدا زیاد و سپس ثابت و بالاخره روند کاهشی نشان داد. با توجه به نمودار ۳ مشاهده می گردد که رشد باکتری میکروکوکوس واریانس فقط در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر کریزن، با گذشت زمان افزایش می یابد و در سایر غلظت ها (بخصوص غلظت ۰/۳ و ٠/٤) پس از ساعت ٤٨ رشد ثابت و در نهایت کاهش یافته است. بالاخره در مورد باکتری باسیلوس کوآگولانس همانطور که در نمودار ٤ ملاحظه می شود باکتری در غلظت ۰/۳ با گذشت زمان کاهش رشد نشان می دهد و پس از ساعت ۷۲ رشد ثابت مانده است. در غلظت ٠/٤ گرم بر لیتر کریزن رشد باکتری تقریباً صفر شده است.

[1] *Pseudomonas putida*
[2] *Mycobacterium* sp
[3] *Micrococcus varians*
[4] *Bacillus coagulans*

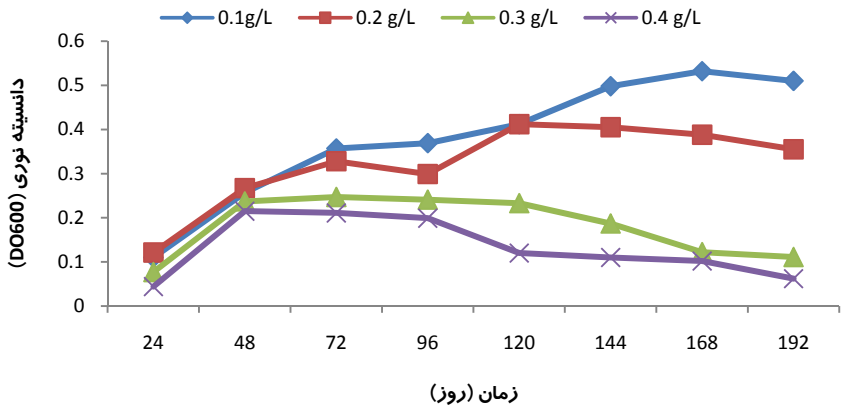
[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]



نمودار ۱. منحنی رشد باکتری سودوموناس پوتیدا در غلظت های مختلف کریزن

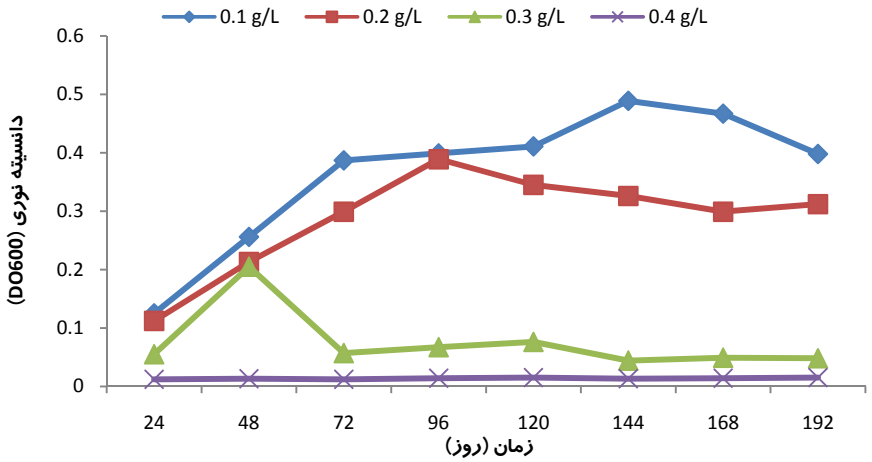


نمودار ۲. منحنی رشد گونه های باکتری مایکوباکتریوم در غلظت های مختلف کریزن



نمودار ۳. منحنی رشد باکتری میکروکوکوس واریانس در غلظت های مختلف کریزن

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]



نمودار٤. منحنی رشد باکتری باسیلوس کوآگولانس در غلظت های مختلف کریزن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی نشان داد که سودوموناس پوتیدا در طی ۱۰ روز ۹۵ درصد از کریزن با غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر را تجزیه کرده، گونه های مایکوباکتریم ٧٤ درصد، میکروکوکوس واریانس ۵۸ درصد و باسیلوس کوآگولانس ٤٢ درصد از کریزن را تجزیه کرده است.

بحث

در آزمایش های انجام شده از کریزن به عنوان تنها منبع کربن استفاده شده و از آنجا که کریزن جزءِ هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با وزن مولکولی بالاست در نتیجه تجزیه میکروبی آن سخت‌تر است [۱۸].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد هنگامی که غلظت کریزن افزایش یابد، باکتری قادر به رشد نبوده وبه لحاظ نبود منبع کربن مناسب و سمی بودن کریزن برای میکروارگانیسم، از بین می رود. از بین باکتری های جداسازی شده سودوموناس پوتیدا در غلظت های مختلف کریزن بیشترین تجزیه کنندگی را از خود نشان داد که به دلیل مقاوم بودن این باکتری در محیط های مختلف می باشد. از طرفی سودوموناس هادارای آنزیم های مختلف تجزیه کننده می باشد و همین ویژگی به آن ها توانایی تجزیه ترکیب ٤ حلقه‌ای کریزن را می دهد. همچنین آنالیز کروماتوگرافی این نتایج را تایید کرد، به طوری که سودوموناس پوتیدا نسبت به بقیه بیشترین میزان تجزیه کریزن را از خود نشان داد و از آن جا که افزایش غلظت کریزن اثر منفی بر رشد آن نداشته به عنوان بهترین سویه در تجزیه این نوع هیدروکربن شناخته شد.

در واقع گونه های بسیاری در تجزیه ترکیبات نفتی جدا سازی شده اند، ولی گونه های سودوموناس به عنوان توانمندترین گونه های شاخص شناخته شده اند و حضور آن ها در اغلب شرایط محیطی، عامل مهمی است که استفاده از آن ها را در اغلب محیط ها ممکن می سازد [۱۹]. قدرت تجزیه کنندگی سودوموناس پوتیدا به دلیل تولید بیوسورفاکتانت هایی بیان شده که باعث افزایش امولسیونه شدن هیدروکربن های نفتی و همچنین تغییر در کشش سطحی و اتصال هیدروکربن به سطح سلول باکتری ها می شود [۲۰].

نتایج مربوط به سینتیک رشد این باکتریها در غلظت های مختلف کریزن حاکی از آن است که دو باکتری میکروکوکوس واریانس و

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

باسیلوس کوآگولانس قادر به رشد در غلظت های پائین کریزن هستند. در حالیکه باکتری سودوموناس پوتیدا و تا حدودی گونه‌های مایکوباکتریم در غلظت های بالای کریزن قادر به رشد هستند.

سمی بودن کریزن و در نتیجه مهار رشد باکتری ها در حضور آن، می تواند به این دلیل باشد که هیدروکربن های لیپوفیلیک در غشاءِ دو لایه ای چربی باکتری ها، تجمع پیدا کرده و بر خواص ساختمانی و عمل این غشاها تاثیر می‌گذارند. تجمع مولکول های هیدروکربن منجر به از بین رفتن غشا، افزایش قابلیت نفوذپذیری پروتون و در نتیجه اتلاف نیروی محرک پروتون و تخریب ثبات pH درون سلولی خواهد شد [۶].

تا کنون مطالعات زیادی بر روی اندازه گیری میزان تجزیه ترکیبات آروماتیک وهمچنین سینتیک رشد آن‌ها صورت گرفته است.

جان[1] و همکاران در سال ۲۰۱۲ باکتری های تجزیه‌کننده هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای را از خاک آلوده در نیجریه جدا کردند. باکتری های میکروکوکوس واریانس، سودوموناس پوتیدا و آلکالی ژنز فیکالیس توانایی زیادی در تجزیه کریزن، فنانترن و نفتالن نشان دادند. باکتری آلکالی ژنز فیکالیس بیشترین رشد و تجزیه را در حضور کریزن نسبت به دو باکتری دیگر نشان داد. به طوری که بیشترین دانسیته نوری (رشد) این باکتری در غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر کریزن و کمترین آن در غظت ۰/۰۹ میلی گرم بر لیتر کریزن بدست آمد. پس از این باکتری، سودوموناس پوتیدا رشد بهتری را نشان داد [۲۱]. در تحقیق حاضر نیز هرچه غلظت کریزن بیشتر می شد دانسیته نوری کاهش پیدا می کرد. باکتری سودوموناس پوتیدا به عنوان قوی ترین باکتری نسبت به دیگر باکتری های جداشده، بیشترین دانسیته نوری را در همه غلظت های مورد آزمایش نشان داد.

ایگوو-ازیکپه و همکاران در سال ۲۰۰۶ باکتری‌های تجزیه کننده کریزن را در خاکهای نفتی جداسازی نموده و سینتیک رشد سویه های جدا شده را در حضور سوبسترای کریزن مورد ارزیابی قرار دادند. در تحقیق آن ها باکتری های اسینتوباکتر آنیتراتوس[2]، آلکالی ژنز فیکالیس، اسینتوباکتر مالئی[3] و میکروکوکوس واریانس شناسایی شدند. باکتری اسینتوباکتر آنیتراتوس بهترین تجزیه کننده کریزن شناخته شد، به طوری که بیشترین دانسیته نوری ($OD_{۶۰۰}$) را پس از ۳۵ روز گرما گذاری به خود اختصاص داد. در تحقیق حاضر نیز باکتری میکروکوکوس واریانس جداگردید ولی از نظر قدرت تجزیه کریزن در رده سوم قرار گرفت [۶].

یو- بینگ[4] و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی باکتری های تجزیه کننده کریزن در یک کارخانه ذغال سنگ و منحنی رشد آن ها در حضور این ماده پرداختند. در این مطالعه باکتری پارکوکوس آمینوورانس[5] به عنوان باکتری تجزیه کننده کریزن شناخته شد. این باکتری توانست در مدت ۸ روز، ۸۵/۲ درصد از ماده کریزن با غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر را تجزیه نماید. دانسیته نوری ($OD_{۶۰۰}$) این باکتری با گذشت زمان افزایش یافت و در روز هشتم به مقدار ماکزیمم رسید. همزمان با افزایش دانسیته نوری، کریزن بیشتری توسط باکتری تجزیه گردید [۲۲]. در تحقیق جاری نیز با افزایش دانسیته نوری باکتری ها، کریزن بیشتری تجزیه گردید به طوری که در روز دهم بیشترین تجزیه انجام شد. این موضوع منطقی به نظر می رسد زیرا با گذشت زمان باکتری ها از کریزن به عنوان تنها منبع کربن

[1] John

[2] *Acinetobacter anitratus*
[3] *Acinetobacter mallei*
[4] Yu-bing
[5] *Paracoccus aminovorans*

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

استفاده کرده و رشد و تکثیر می یابند. به دنبال افزایش تعداد باکتری ها، کدورت لوله آزمایش افزایش یافته و در نتیجه دانسیته نوری افزایش می‌یابد.

سارما[1] و همکاران در سال ۲۰۰٤ تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه ای توسط باکتری لکلرسیا آدکربوکسیلاتا[2] را مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق باکتری مذکور توانست پس از ۲۰ روز، ٤۰/۶-۷۳/۲ درصد از مقدار هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را تجزیه کند [۲۳].

کورال[3] در سال ۲۰۰۵ باکتری های تجزیه کننده فنانترن را از خاک های پالایشگاه نفتی جدا کردند و میزان تجزیه فنانترن را مورد ارزیابی قرار دادند.

در این تحقیق چندین سویه از سودوموناس به عنوان باکتری های مقاوم شناسایی شدند. دو سویه از سودوموناس پس از ۷ روز توانستند غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر فنانترن را به میزان ۹۳ و ۹۸ درصد تجزیه کنند [۲٤]. در تحقیق حاضر نیز سودوموناس به عنوان مقاوم ترین باکتری شناخته شد که توانست ۹۵ درصد غلظت اولیه کریزن (۰/۱ گرم بر لیتر) را تجزیه کند.

نتیجه گیری

در این تحقیق از بین باکتری های بومی جدا شده و توانمند در تجزیه کریزن، یعنی سودوموناس پوتیدا، گونه‌های مایکو باکتریم، میکروکوکوس واریانس و باسیلوس کوآگولانس، باکتری سودوموناس پوتیدا به عنوان قوی ترین باکتری در تجزیه کریزن شناخته شد. به طوری که دانسیته نوری آن ($OD_{٦٠٠}$) در تمام غلظت ها نسبت به دیگر باکتری های تجزیه کننده بیشتر بود. گونه‌های مایکوباکتریم در رده دوم قرار گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس به دلیل حمایت اجرایی اعلام می‌دارند.

[1] Sarma
[2] *Leclercia adecarboxylata*
[3] Coral

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

References

1- Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, Dewatcher R, Verachtert H and Diels L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) - degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(5); 1834-1843.

2- Whyte LG, Bourbonniere L, Greer CW. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) catabolic pathways. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(9): 3719-3723.

3- Kafilzadeh F, Sahragard P, Jamali H, Tahery Y. Isolation and identification of hydrocarbons degrading bacteria in soil around shiraz refinery. Afr J Microbiol Res. 2011; 4(19): 3084-3089.

4- Amiryani T, Pourshams A, Semnani Sh, Malekzadeh R. High Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons May Contribute to High Risk of Esophageal Cancer in Northeastern Iran. Digestion. 2004; 9(2): 90-94

5- Van Mouweric M, Stevens L, Seese MD, Basham W. Environmental contaminant encyclopedia, oil, used moter oily entry. National Park Service, Water Resources Divisions, Forth Collins, Colorado, 1997: 25.

6- Igwo-Ezikpe MN, Gbenle OG, Ilori MO. Growth. Study on chrysen degraders isolated from polycychic aromatic hydro carbone polluted soils in Nigeria. Afr J Biotechnol. 2006; 5(10): 823-828.

7- Manilal VB, Alexander M. Factors affecting the microbial degradation of Phenanthrene in soil. Appl Microbiol Biotechnol.1991; 35(3): 401-405.

8- Mille G, Almallah M, Bianchi M, Wambeke F, Bertrand JC. Effect of Salinity on Peteroleum biodegradation. Fresenius J Anal Chem. 1991; 339: 788-791.

9- Gutte SL, Hamde VS. Bio-remediation of chrysene by *Achromobacter insolitus* isolated from oil contaminated soil. Natl J Life Sci. 2010; 7(2): 171-174.

10- Dhote M, Juwarkar A, Kumar A, Kanade GS, Ghakrabarti T. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26(2): 329-335.

11- Igwo-Ezikpe MN, Gbenle OG, Ilori MO, Okpuzor J, Osuntoki AA. Evaluation Alcaligenes faecalis degradation of chrysene and diesel oil with contaminant production of biosurfactant. Res J Environ Toxicol. 2009; 3(4): 159-169.

12- Nayak AS, Sanjeev Kumar S, Santosh Kumar M, Anjaneya O, Karegoudar TB. A catabolic pathway for the degradation of chrysene by Pseudoxanthomonas sp. PNK-04. FEMS Microbiol Lett. 2011; 320(2): 128-134.

13- Xiaofan Z, Oyaizu H. Study on isolation and identification and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria. Shanghai Environ Sci. 2003; 22(8): 544-547.

14- Asadi Z. Bacterial degradation of naphthalene, phenanthrene, anthracene. Thesis of MS. Tehran University. 2005: 90-95.

15- Garrity GM, Brenner DJ, Krig NR, Staley(ed) JT. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Spriger, New York. 2005: 323-384.

16- Kafilzadeh F, Javid H, Mohammadi H. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria of Tashk lake and salt concentration effect on them. Iran Sci Fish Journal. 2007; 103-111 (Full text in persian).

17- Hunter RD, EKunwe SIN, Dodor DE, Hwang H.M, Ekunwe L. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a] pyrene. Int J Environ Res Public Health. 2005; 2(2): 267-271.

18- Caldini G, Cenci G, Manenti R, Morozzi G. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol. 1995; 44(1-2): 225-229.

19- Okoh AI. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. Afr J Biotechnol. 2003: 2(5); 104-108.

20- Kumar M, Leon V, Materano ADS, Ilzins OA, Galindo-Castro I, Fuenmayor SL. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas* sp. IR1. Z Naturforsch C. 2006: 61(3-4); 203-12.

21- John RC, Essein JP, Akpan SB, Okpokwasili GC. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. Bull Environ Contam Toxicol. 2012; 88(6): 1014-1019.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

22- Yu-bing T, Xu Y, Fang-yang C, Rui- ling J, Xin- gang W. Screening, identification and degradating gene assignment of a chrysene-degrading strain. Afr J Biotechnol. 2011; 10(34): 6549-6557.
23- Sarma PM, Bhattacharya D, Krishnan S, Lal B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(5): 3163–3166.
24- Coral G, Karagoz S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Ann Microbiol. 2005; 55(4): 255-259.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]

Isolation of Chrysene Degrading Bacteria from Soils of Pars Special Economic Energy Zone (Assaluyeh) and Investigating Chrysene Removal by Them

Kafilzadeh F[1]*, Sehatnezhad N[2], Gudarzian N[3]

1- Associate professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2- MSc, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
3- Assistant professor, Department of Chemistry, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

* Corresponding author. Tel: +989171140799 Fax: +987116262102 E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir

Received: 17 Apr 2012 Accepted: 2 Oct 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: Polycyclic aromatic hydrocarbons due to their toxicity, carcinogenicity, and resistant to bacterial degradation are considered as one of the important environmental threatening factors. Chrysene is an aromatic compound with four rings. In this research chrysene degrading bacteria were isolated from oil contaminated soils in pars special economic energy zone. Degradation of chrysene in laboratory condition and the effect of different chrysene concentration on bacterial growth were investigated.

Methods: After filtration of samples they were cultivated in culture medium containing inorganic compounds and chrysene and then incubated at 32°C for two weeks. Isolated bacteria were identified by common microbiological and biochemical tests. The rate of bacterial growth was evaluated by measuring optical density (OD_{600}) in presence of 0.1-0.4 g/l chrysene. Degradation and removal rate of chrysene by isolated bacteria was investigated using chromatography machine.

Results: Four bacterial species; *Pseudomonas putida, Mycobacterium* sp*, micrococcus varians* and *Bacillus coagulans* were isolated and identified. *Pseudomonas putida* was the strongest bacteria for chrysene degradation. The bacterium grew in minimum possible time and its optical density was higher than other bacteria for all the concentrations tested. This bacterium degraded and removed 95% of chrysene with primary concentration of 0.1 g/l during 10 days. *Mycobacterium* sp was the second strongest *bacterium for chrysene degradation.* The weakest bacterium in chrysene degradation was *Bacillus coagulans that* degraded 42% of chrysene after 10 days.

Conclusion: *Pseudomonas putida* had the highest optical density and degradation ability for chrysene. Due to different reasons such as presence at different environmental conditions and having degrading enzymes this bacterium has the ability to degrade and remove polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords: Chrysene; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Bioremediation; *Pseudomonas putida*; *Mycobacterium* sp

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-06-08]