جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه کننده نفتالین از رسوبات خلیج نایبند و بهینه‌سازی تجزیه زیستی نفتالین توسط آن

محسن شهریاری مقدم: گروه زیست شناسی‌دریا، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه شهید بهشتی
غلامحسین ابراهیمی‌پور*: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
بهروز ابطحی: گروه زیست شناسی‌دریا، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه شهید بهشتی
علی‌رضا قاسمپور: گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: بهمن ١٣٩١ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ١٣٩٢

چکیده

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده نفتالین از رسوبات خلیج نایبند و بهینه‌سازی تجزیه زیستی نفتالین توسط کارآمدترین سویه خالص شده رسوبات لایه هوازی به‌همراه آب دریا از قسمت‌های مختلف جنگل‌های مانگرو خلیج نایبند جمع‌آوری شدند. رسوبات نمونه‌برداری شده به محیط پایه معدنی حاوی نفتالین به‌عنوان تنها منبع کربن اضافه شد و پس از غربال‌گری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالین، باکتری‌های مورد نظر در محیط جامد خالص‌سازی شدند. کارایی باکتری‌های خالص در تجزیه نفتالین در دو نوع محیط کشت (محیط کشت اول: محیط پایه معدنی حاوی ١٠٠٠ میلی‌گرم در لیتر نفتالین و محیط کشت دوم: محیط پایه معدنی حاوی١٠٠٠ میلی‌گرم در لیتر نفتالین + ٨٠-Tween) بررسی گردید. سنجش میزان نفتالین باقی‌مانده در محیط‌های کشت توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام گرفت. از میان سویه‌های خالص شده، سویه SBU٣ بهترین عملکرد را در تجزیه نفتالین در حضور ٨٠-Tween (٤٥/٦٠٪) و عدم حضور آن (٣٠/٣٩٪) دارا بود. این سویه پس از تعیین سکانس ژن ١٦S rDNA، ٩٩٪ شباهت به گونه *Marinobacter aquaeoli* را نشان داد. مطالعه مقادیر بهینه pH و نسبت مولی C/N در تجزیه نفتالین در حضور ٨٠-Tween نشان داد سویه SBU٣ در pH ٧/٥ و نسبت مولی ١٠٠:١٠، C/N بهترین عملکرد را در تجزیه نفتالین دارد و بالغ بر ٨٥٪ نفتالین را در طی ٧ روز تجزیه می‌کند. به‌علاوه نتایج پیروی کنتیک حذف نفتالین توسط سویه مذکور از مدل درجه اول را نشان داد.

کلمات کلیدی: نفتالین، *Marinobacter aquaeolei*، شرایط بهینه، تجزیه زیستی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: G-Ebrahimi@sbu.ac.ir

مقدمه

ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) از آلاینده‌های مهم محیط زیست محسوب می‌شوند (Hartash و Kaushik، ۲۰۰۹). نشت و ریزش نفت، کشتیرانی، جاری شدن آب‌های شهری و فعالیت‌های صنعتی مهم‌ترین عوامل انتشار این مواد به محیط‌زیست دریاها می‌باشند (Li و همکاران، ۲۰۰۹؛ Tian و همکاران، ۲۰۰۸؛ Tam و Wong، ۲۰۰۸). نفتالین یکی از این ترکیبات است که در بافت‌های مهره‌داران و بی‌مهره‌گان دریایی تجمع پیدا کرده و در نهایت از طریق مصرف غذا وارد بدن انسان‌ها می‌گردد. نفتالین توسط آژانس‌های بین‌المللی مانند آژانس بین‌المللی تحقیق بر روی سرطان (IARC) و آژانس حفاظت از محیط‌زیست (EPA) در زمره مواد سرطان‌زا طبقه‌بندی شده است (Preuss وDrexler ، ۲۰۰۳). خصوصیات سمی و سرطان‌زایی نفتالین به همراه پایداری آن در محیط‌زیست بیانگر اثرات مخاطره‌آمیز این ترکیب بر محیط‌زیست می‌باشد (Feijoo-Siota و همکاران، ۲۰۰۸؛ Bamforth و Singleton، ۲۰۰۵).

از شناخته شده‌ترین روش‌های حذف PAHs از محیط تبخیر، اکسیداسیون نوری و شیمیایی و تجزیه زیستی می‌باشند. از میان روش‌های ذکر شده تجزیه زیستی با توجه به هزینه و مخاطرات کم‌تر زیست‌محیطی از اهمیت شایانی برخوردار است. در سال‌های اخیر باکتری‌های مختلفی از قبیل *Pseudomonas putida*، *Mycobacterium sp.*، *Rhodococcus opacus*، *Nocardia otitidscaviarum*، *Bacillus pumilus*، *Bacillus fusiformis*، *Oscillatoria sp.*، *Alcaligenes sp.*، *Pseudomonas stutzeri* (Lin و همکاران، ۲۰۱۰؛ Hwang و همکاران، ۲۰۰۹؛ Feijoo-Siota و همکاران، ۲۰۰۸؛ Zeinali، ۲۰۰۸)، برای تجزیه زیستی نفتالین استفاده شده‌اند.

مواد مغذی از مهمترین فاکتورهای تاثیرگذار بر تجزیه زیستی هستند و نسبت‌های مختلف بهینه برای تجزیه زیستی PAHs گزارش شده است (Bouchez و همکاران، ۱۹۹۵؛ Wilson و Jones، ۱۹۹۳). فاکتورهای دیگری از قبیل pH نیز نقش مهمی در تجزیه زیستی ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای ایفا می‌کنند. جهت افزایش راندمان تجزیه زیستی، نقش هر فاکتور و هم‌چنین ترکیب مناسب فاکتورها باید مطالعه شوند (Leahy و Colwell، ۱۹۹۰). جنگل‌های مانگرو از جمله مناطقی هستند که در معرض آلودگی حاد و یا مزمن هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند (Tam و Wang، ۱۹۹۶). غلظت بالای کربن آلی، سولفید و آهن در رسوبات و هم‌چنین شرایط بی‌هوازی محیط مانگرو را برای تجمع آلاینده‌ها مناسب کرده است. مطالعات زیادی در خصوص تجزیه زیستی PAHs در جنگل‌های مانگرو صورت گرفته است که از آن‌ها می‌توان به مطالعات انجام شده توسط Burns و همکاران (۲۰۰۰)، Zhou و همکاران (۲۰۰۶)، Tam و Wong (۲۰۰۸)، Tian و همکاران (۲۰۰۸)، Haritash و Kaushik (۲۰۰۹) و هم‌چنین Liu و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد.

با توجه به مطالب ذکر شده این مطالعه با هدف جداسازی بهترین سویه مصرف‌کننده نفتالین از رسوبات جنگل‌های مانگرو خلیج نایبند و به‌دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای pH و نسبت C/N انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

مقداری از رسوبات لایه هوازی به‌همراه آب دریا از قسمت‌های مختلف جنگل‌های مانگرو خلیج نایبند در استان بوشهر به‌صورت تصادفی جمع‌آوری و در بطری استریل ریخته شدند. ظرف نمونه‌برداری تا زمان ایزوله کردن باکتری‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. فاکتورهای محیطی شامل دما، pH و شوری نیز در محل توسط دستگاه HQ۴۰d multimeter مدل HAch اندازه‌گیری شدند.

جداسازی باکتری‌های مصرف کننده نفتالین

در حدود ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسون رسوب- آب نمونه‌برداری شده به یک ارلن شیاردار ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه معدنی ((mineral salts medium (MSM) و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین به‌عنوان منبع کربن اضافه گردید. سپس با استفاده از اسیدکلریک ۱N، pH بر روی ۸ (همانند pH محیط) تنظیم و محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۴۰ rpm به‌مدت یک هفته انکوبه شد. محیط پایه معدنی حاوی ۰/۵ گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱ گرم کلریدمونیوم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن و هم‌چنین ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر میکرو در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دریای فیلتر شده (۴۰ppt) بود. محلول عناصر میکرو شامل ۷۰ میلی‌گرم کلرید روی، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید منگنز، ۲۰۰ میلی‌گرم کلرید کبالت، ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید نیکل، ۲۰ میلی‌گرم کلرید مس II، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۲۶ میلی‌گرم سلنیت سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات سدیم،

۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲۵ درصد در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (Schlegel، ۱۹۹۲). نفتالین به‌صورت استوک غلیظ در استون تهیه و سپس به ارلن‌های خالی استریل اضافه و پس از تبخیر استون محیط MSM به ارلن‌ها اضافه گردید. پس از گذشت یک هفته مجدد ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت به ارلن شیاردار دیگری حاوی نفتالین و MSM منتقل و این فرایند ۴ بار تکرار گردید. در پایان ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت نهایی برداشته و با تهیه رقت سریال تا غلظت 10^{-8} بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت نوتریت آگار کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته انکوبه شدند. کلنی‌های باکتری با مرفولوژی‌های مختلف پس از کشت‌های متوالی خالص-سازی گردیدند. سویه‌های خالص شده سپس در ارلن‌های شیار دار حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث با شوری ۴۰ppt، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۴۰ به-مدت ۳ روز انکوبه شدند. باکتری‌ها با استفاده از سانترفیوژ یخچال‌دار Hermle Z۳۲۳K رسوب داده شدند و از آن‌ها جهت تلقیح ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MSM به‌همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین با OD نهایی ۰/۲ استفاده گردید. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۴۰rpm انکوبه شدند. پس از گذشت یک هفته میزان حذف نفتالین توسط سویه‌های مختلف اندازه‌گیری گردید. جهت مطالعه تاثیر Tween-۸۰ به‌عنوان سورفکتانت بر روی میزان حذف نفتالین یک سری آزمایش با شرایط بالا به‌همراه w/w ٪ ۱ Tween-۸۰ نیز به‌صورت هم‌زمان انجام پذیرفت. برای اندازه‌گیری میزان حذف غیرزیستی نفتالین محیط‌هایی مشابه شرایط ذکر شده بدون تلقیح باکتری انکوبه شدند. در پایان سویه‌ای که بیش‌ترین توان مصرف نفتالین را دارا بود به‌عنوان سویه برتر انتخاب گردید.

شناسایی باکتری خالص شده

شناسایی سویه خالص شده با استفاده از خصوصیات میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم و اسپور) تست‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ۱۶S rDNAصورت گرفت. تست‌های بیوشیمیایی از قبیل اکسیداز، کاتالاز، احیای نیترات، تخمیر قندها و مصرف اوره انجام شدند. جهت تعیین توالی ۱۶S rDNA، DNA کروموزمی توسط کیت استخراج DNA، Roche استخراج گردید. تکثیر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از پرایمرهای ۲۷ ۵- -۳ و ۳- ۵- ۱۵۱۰ صورت گرفت. پس از تعیین توالی‌های مورد نظر میزان شباهت آن با توالی‌های موجود در Gene Bank مقایسه گردید.

بررسی شرایط بهینه رشد باکتری و تجزیه نفتالین

برای تعیین شرایط بهینه حذف نفتالین توسط باکتری ایزوله شده، به‌ترتیب تأثیر فاکتورهای pH و غلظت منبع نیتروژن بر روی رشد باکتری در ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MSM و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین به‌عنوان تنها منبع کربن با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور تعیین اثر pH در رشد و تجزیه نفتالین، pH محیط‌ها با افزودن بافر Tris/HCl ۰/۱ M در محدوده ۶ تا ۸/۵ با اختلاف ۰/۵ واحد تنظیم گردید. جهت تعیین بهینه مقدار نیتروژن لازم برای رشد و تجزیه نفتالین، نسبت‌های مولی ۱۰۰:۵، ۱۰۰:۱۰، ۱۰۰:۲۰ و ۱۰۰:۴۰ کربن به نیتروژن معادل ۰/۲۰، ۰/۴۱، ۰/۸۳ و ۱/۶۷ گرم NH_4Cl افزوده شد و pH آن‌ها بعد از افزودن بافر Tris/HCl ۰/۱ M، بر روی ۷/۵ (pH بهینه) تنظیم شد. اضافه کردن نفتالین به محیط‌ها مشابه روش ذکر شده در بالا صورت گرفت. در تمامی آزمایش‌ها از آب دریای فیلتر شده خلیج نایبند استفاده و ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر اربیتال با دور ۱۴۰ rpm انکوبه شدند. تلقیح باکتری به محیط‌ها پس از رشد سویه خالص شده در محیط نوترینت براث مشابه روش ذکر شده در بالا با $OD_{۶۰۰}$ نهایی ۰/۲ اضافه گردید. شرایط بهینه با بررسی کدورت سلولی به‌عنوان شاخص‌های رشد باکتری و مصرف نفتالین در نظر گرفته شد. بدین منظور روزانه، یک میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و سانتریفوژ گردیدند (۵ دقیقه در گرم×۱۰۰۰۰). رسوب حاصل توسط آب دریای فیلتر شده شستشو داده شد و مجدداً سانتریفوژ انجام شد (۵ دقیقه در گرم×۱۰۰۰۰). در پایان کدورت سلولی با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد.

کنتیک حذف زیستی نفتالین

کنتیک حذف زیستی نفتالین از محیط کشت با مدل درجه اول $C=C_0.e^{-kt}$ تطبیق داده شد. در این مدل C: غلظت نفتالین در محیط در زمان t، C_0: غلظت اولیه نفتالین در محیط و k: ضریب ثابت معادله است.

استخراج و سنجش میزان نفتالین در محیط‌های کشت مایع

استخراج نفتالین از محیط‌های کشت براساس روش ارائه شده توسط Wu و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی تغییرات انجام گرفت. در ابتدا ۲۰ میکرولیتر (۱۰۰ppm) m-terphenyl به ارلن‌های حاوی محیط کشت به‌عنوان استاندارد داخلی اضافه

شد. سپس به هر ارلن ۲۵ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌خوبی مخلوط گردید. سپس فاز آلی جدا شده و فاز آبی مجددا توسط ۲۵ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج گردید. در پایان دو استخراج با هم مخلوط و توسط سولفات سدیم به‌طور کامل آب‌گیری شدند و حجم نهایی به ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. در حدود ۱ میلی‌لیتر از استخراج به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تیره منتقل و تا زمان آنالیز در فریزر نگه‌داری شدند. جهت آنالیز نمونه‌ها ۱ میکرولیتر از محلول استخراج شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent ۷۸۹۰A مجهز به آشکارساز FID تزریق گردید. ستون استفاده شده در دستگاه از نوع HP-۵MS مویین (Agilent) به‌طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ۰/۲۵ ضخامت لایه داخلی بود. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آشکارساز ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز نیتروژن به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه دمایی آون به‌صورت زیر تنظیم گردید. دمای آون ابتدا بر روی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید سپس به‌مدت ۲ دقیقه در همین دما نگه داشته شد و سپس با سرعت از ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه، دما تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس دما با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در همین دما برای ۱۵ دقیقه نگه داشته شد (Chen و همکاران، ۲۰۰۸).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت مقایسه تاثیر pH و مقدار نیتروژن بر میزان رشد در زمان‌های مختلف از آزمون Repeated Measure ANOVA استفاده شد. تاثیر pH و مقدار نیتروژن بر میزان رشد در زمان‌های مشابه با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و تفاوت معنی‌داری میان pHها و غلظت منبع نیتروژن با کمک آزمون Tukey تعیین گردید. کلیه آنالیزها توسط نرم‌افزار SPSS-۱۳ انجام شدند.

نتایج

سنجش فاکتورهای محیطی

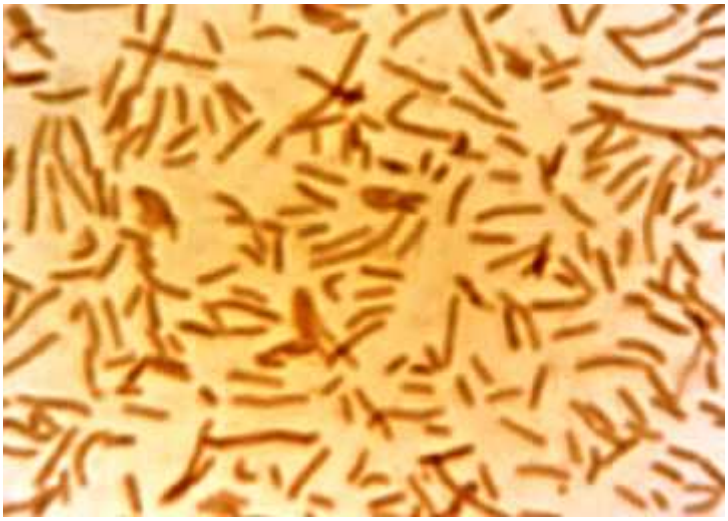
دما، شوری و pH آب در منطقه جزر و مدی در هنگام جذر به‌ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد ، ۴۰ppt و ۸ اندازه‌گیری شدند.

نتایج مرحله غربال‌سازی

۳ سویه باکتریایی در محیط شماره ۱ رشد نمودند که با استفاده از رقت سریال بر روی پلیت‌های حاوی محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شدند و سویه‌های SBU۱، SBU۲ و SBU۳ نام‌گذاری شدند. میزان حذف زیستی نفتالین توسط سویه SBU۱، ۲۷/۳۳ و۲/۴؛ SBU۲، ۳۲/۲۴ و ۳۸/۳۳ و SBU۳، ۶۰/۴۵ و ۳۹/۳ درصد در محیط‌های دارای Tween-۸۰ و فاقد آن پس از ۷ روز انکوباسون به‌ترتیب اندازه‌گیری شد. حذف غیرزیستی نفتالین در محیط‌های کشت مختلف بین ۵ تا ۹ درصد اندازه‌گیری گردید.

شناسایی سویه انتخاب شده

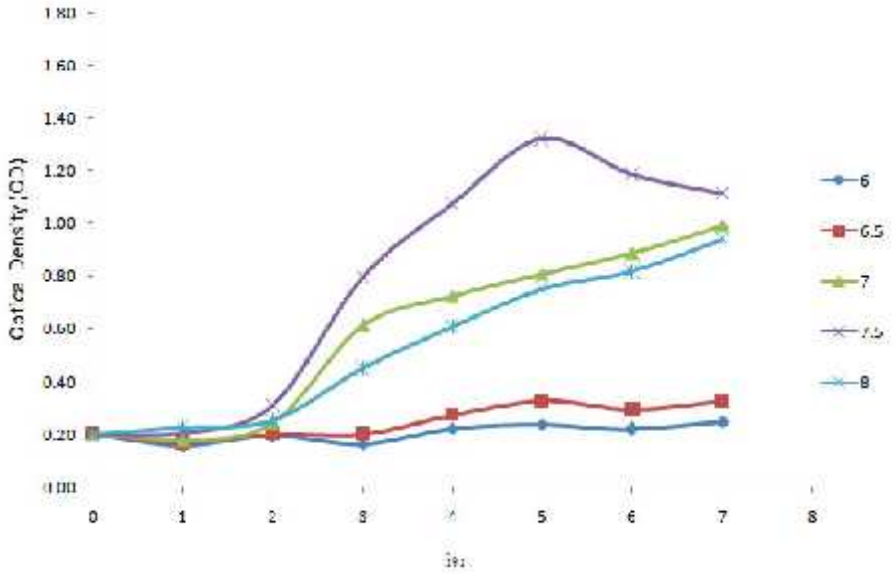
نتایج خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی نشان داد، سویه انتخاب شده یک باکتری گرم منفی، فاقد اسپور، میله‌ای شکل (شکل۱)، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، دارای قابلیت احیای نیترات به نیتریت و اوره آز منفی بود. بر اساس نتایج مطالعات مولکولی سویه خالص شده به‌میزان ۹۹٪ به گونه *Marinobacter aquaeolei* شباهت نشان داد.



شکل ۱: تصویر میکروسکپ نوری *سویه* SBU۳ با رنگ‌آمیزی گرم

نتایج اثر pH بر رشد باکتری

نتایج نشان داد، سویهٔ SBU۳ در محدوده pHهای بین ۶ تا ۸ قادر به رشد و تجزیه نفتالین بود و در pHهای ۶ و ۶/۵ سرعت رشد باکتری کم می‌باشد. در pH ۷/۵ میزان رشد نسبت به سایر pH بالاتر بوده و باکتری در این مدت زودتر وارد مرحله فاز سکون شده است (شکل ۲).



شکل ۲: تاثیر pHهای مختلف بر رشد سویه SBU۳ در محیط پایه معدنی به‌همراه نفتالین به‌عنوان تنها منبع کربن

نتایج آزمون Repeated Measure ANOVA بیانگر آن بود که گذشت زمان تاثیر معنی‌داری بر میزان رشد سلولی در pHهای مختلف دارد (F=۲۴/۷۱۸، p=۰/۰۰۰). نتایج آزمون one-way ANOVA ارتباط معنی‌داری بین میزان رشد سلولی در محیط‌های دارای pHهای مختلف در یک زمان مشخص را نشان داد (جدول ۱). نتایج آزمون پس تجربی Tukey نشان داد در تمامی زمان‌ها به‌جز دو روز اول شروع آزمایش اختلاف معنی‌داری (در سطح ۹۵٪) در میزان رشد سلولی بین pHهای ۶ و ۶/۵ با pHهای ۷، ۷/۵ و ۸ وجود داشته است. نتایج این آزمون هم‌چنین گویای اختلاف معنی‌داری بین pH ۷/۵ با دیگر pHها در روزهای ۴، ۵ و ۶ می‌باشد. با

توجه به منحنی رشد سلولی و نتایج آزمون‌های آماری pH ۷/۵ به‌عنوان pH بهینه در نظر گرفته شد.

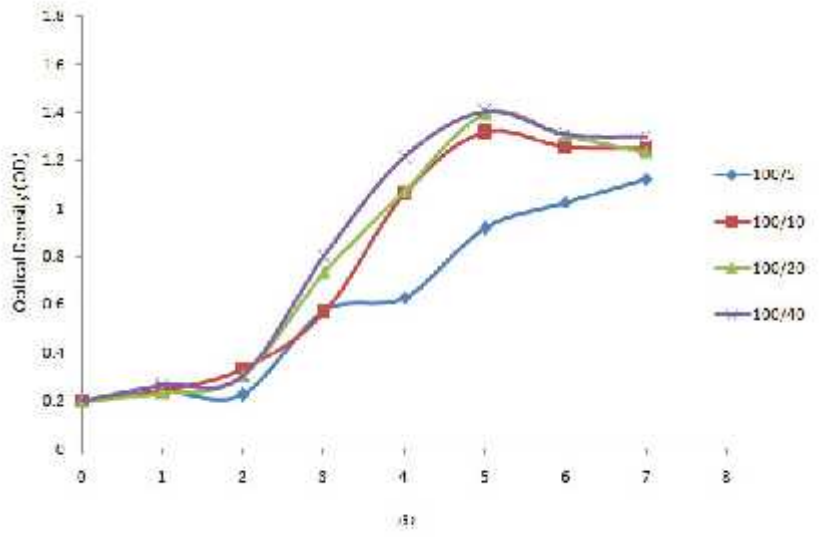
جدول ۱: مقاسیه بین میزان رشد سلولی باکتری SBU در محیط‌های دارای pHهای متفاوت و مقادیر مختلف NH_4Cl در روزهای مختلف

	روز ۱		روز ۲		روز ۳		روز ۴		روز ۵		روز ۶		روز ۷	
	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F
pH	۰/۰۰	۶/۲۱	۰/۰۰	۱۵/۸۳	۰/۰۰	۱۳۶/۵۹	۰/۰۰	۱۶۱/۷۰	۰/۰۰	۱۹۶/۳۹	۰/۰۰	۲۳۱/۸۰	۰/۰۰	۱۰۰/۴۰
N	۰/۳۸	۱/۱۶	۰/۰۰	۸/۸۰	۰/۰۰	۵۲/۵۰	۰/۰۰	۷۲/۴۳	۰/۰۰	۱۲۶/۶۶	۰/۰۰	۲۷/۴۰	۰/۰۰	۱۲/۶۹

$N:NH_4Cl$

نتایج اثر غلظت منبع نیتروژن (NH_4Cl) بر رشد باکتری

انتخاب غلظت منبع نیتروژن بهینه با لحاظ نمودن pH ۷/۵ صورت گرفت. همان‌طورکه در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، باکتری در تمام مقادیر نیتروژن مورد آزمایش قادر به رشد بوده و بیش‌ترین میزان رشد در بالاترین غلظت منبع نیتروژن صورت گرفته است. با توجه به شکل با افزایش میزان نیتروژن بر میزان رشد به‌جز در روز اولیه آزمایش افزوده می‌شود. نتایج آزمون Repeated Measure ANOVA بیانگر آن بود که گذشت زمان تاثیر معنی‌داری بر میزان رشد سلولی در غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن دارد (F=۲۵۳/۷۴، p=۰/۰۰۰). نتایج آزمون one-way ANOVA نشان داد به‌جز در ۲۴ ساعت اولیه شروع آزمایش ارتباط معنی‌داری بین میزان رشد سلولی در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن در یک زمان مشخص وجود دارد (جدول ۱). اگر چه نتایج پس آزمون Tukey تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای دارای غلظت‌های ۰/۴۱، ۰/۸۳ و ۱/۶۷ گرم کلریدآمونیوم نشان نداد اما میزان رشد در غلظت ۰/۲۰ به‌جز در ۲۴ ساعت اولیه شروع آزمایش نسبت به دیگر تیمارها کم‌تر و تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها (به استثنای محیط دارای غلظت ۰/۴۱ گرم کلریدآمونیوم در روز ۳) نشان داد. با توجه به اطلاعات به‌دست آمده مقدار بهینه N برای مصرف نفتالین توسط سویه معادل ۰/۴۱ گرم NH_4Cl در نظر گرفته شد.

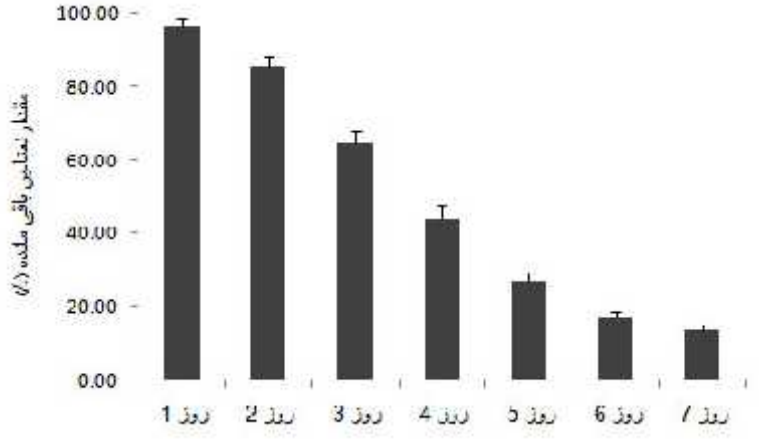


شکل ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف منبع نیتروژن بر رشد سویه SBU۳ در محیط پایه معدنی به‌همراه نفتالین به‌عنوان تنها منبع کربن

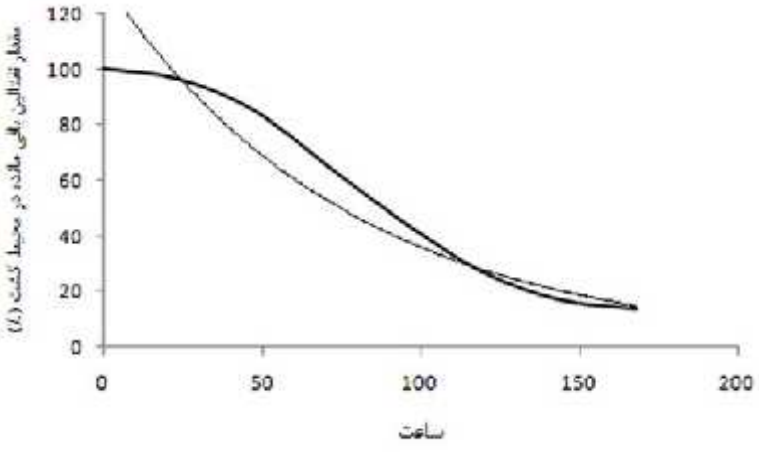
کنتیک حذف نفتالین در شرایط بهینه رشد

شکل‌های ۴ و ۵ نشان‌دهنده میزان حذف زیستی نفتالین در محیط پایه معدنی حاوی۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نفتالین به همراه Tween-۸۰ ٪۱ می‌باشد. همان‌طورکه نمودار نشان می‌دهد سویه SBU۳ پس از به‌دست آوردن شرایط بهینه قادر است بالای ۸۵٪ درصد نفتالین را در کم‌تر از یک هفته مصرف کند. با انطباق نتایج با مدل درجه اول، تبعیت بالای نتایج با این مدل تایید گردید.

$C=۱۳۲/۵\ e^{-۰/۰۱t}$ $R_۲= ۰/۹۴$



شکل ۴: میزان حذف زیستی نفتالین از محیط کشت پایه معدنی در زمان‌های مختلف توسط سویه SBU۳ در شرایط بهینه رشد



شکل ۵: میزان نفتالین باقی مانده در محیط کشت پایه معدنی تلقیح شده با سویه SBU۳ و تطبیق داده‌های به‌دست آمده با مدل درجه اول

بحث

توان تجزیه زیستی رسوبات آلوده به ترکیبات حلقوی وابسته به باکتری‌هایی است که از این ترکیبات به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و در نهایت این مواد را در شرایط هوازی به دی اکسید کربن تبدیل می‌کنند(Wilson و Jones، ۱۹۹۳). نتایج مطالعه حاظر نشان داد، سویه‌های جدا شده از رسوبات جنگل‌های مانگرو خلیج نایبند قادر به تجزیه نفتالین بودند. از بین سه سویه خالص شده، SBU۳ بیش‌ترین میزان حذف نفتالین را (۶۰/۴۵ و ۳۹/۳ درصد در محیط‌های دارای Tween-۸۰ و فاقد آن پس از ۷ روز انکوباسون) دارا بود. محققین زیادی بیان کرده‌اند، استفاده از سورفکتانت‌ها موجب افزایش حذف زیستی PAHs به‌دلیل افزایش حلالیت آن‌ها در محیط می‌شود (Grimberg و همکاران، ۱۹۹۶؛ Volkering و همکاران، ۱۹۹۵)، اگر چه در برخی موارد استفاده از آن‌ها بی‌اثر (Ghosh و همکاران، ۱۹۹۵) و یا حتی دارای اثرات منفی بوده است (Laha و Luthy، ۱۹۹۱). در مطالعه حاضر استفاد از Tween-۸۰ به‌عنوان سورفکتانت در سویه‌های SBU۱ و SBU۳ موجب افزایش تجزیه زیستی و در سویه SBU۲ تا حدی میزان تجزیه زیستی را پایین آورده است که می‌تواند به‌دلیل استفاده باکتری از Tween-۸۰ به‌عنوان منبع کربن و یا اثر سمی آن بر روی باکتری باشد (Liu و همکاران، ۲۰۰۱). با

توجه به توان بیش‌تر سویه SBU۳ در تجزیه نفتالین به‌همراه Tween-۸۰ این سویه به‌عنوان سویه برتر جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای موثر در رشد و مصرف نفتالین انتخاب شد.

نتایج مطالعات مولکولی نشان داد سویه SBU۳ شباهت بالایی به *Marinobacter aquaeolei* دارد. این گونه متعلق به خانواده باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها می‌باشد و گزارش‌هایی در مورد نفت‌خواری توسط این گونه ارائه شده است (Nguyen و همکاران، ۱۹۹۱). هم‌چنین باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات حلقوی مختلفی، از جنس *Marinobacter sp.* گزارش شده است که از آن‌ها می‌توان به مطالعات انجام شده توسط Nguyen و همکاران (۱۹۹۹)، Melcher و همکاران (سال ۲۰۰۲) و Gao و همکاران (۲۰۱۳) اشاره کرد که نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاظر نیز موید نتایج آن‌ها می‌باشد. تجزیه زیستی تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی می‌باشد. شناخت فاکتورهای کلیدی و تعیین شرایط بهینه آن‌ها موجب کارآمدتر شدن تصفیه زیستی می‌شود. مطالعات نشان داده است، استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی جهت تصفیه زیستی مناطق آلوده نسبت به ارگانیسم‌های غیربومی بهتر است (Chen و همکاران، ۲۰۰۸؛ Saponaro و همکاران، ۲۰۰۲). از دلایل این امر می‌توان به مناسب نبودن شرایط محیطی برای ارگانیسم‌های غیربومی اشاره کرد (Launen و همکاران، ۲۰۰۲).

مواد مغذی از مهم‌ترین فاکتورهای موثر در تجزیه زیستی ترکیبات حلقوی می‌باشند و کمبود مواد مغذی موجب کاهش تعداد و کارایی باکتری‌های تجزیه‌کننده این ترکیبات می‌شود (Breedveld و Sparrevik، ۲۰۰۰). دو نوع نسبت مولی C/N ۱/۳ :۱۰۰ (Wilson و همکاران، ۱۹۹۳) و ۱۰۰:۱۰ براساس ترکیب عنصری میکروارگانیسم‌ها (Bouchez و همکاران، ۱۹۹۵) پیشنهاد شده است. برخی از محققین بر این عقیده هستند که نسبت‌های پایین C/N موجب کاهش رشد باکتری‌ها می‌شود (Leys و همکاران، ۲۰۰۵) و نسبت‌های مولی بالا مانند ۱۰۰:۱۰ موجب رشد بالای آن‌ها می‌گردد. در مطالعه حاضر نیز نسبت‌های مولی ۱۰۰:۱۰، ۱۰۰:۲۰ و ۱۰۰:۴۰ نسبت به ۱۰۰:۵ سرعت رشد بالاتری را نشان دادند که تاییدکننده نتایج این محققین می‌باشد.

از دیگر عوامل موثر در تجزیه زیستی، pH محیط است. pHهای مختلف منجر به تغییرات آنزیمی مختلفی در باکتری‌ها می‌شوند و هم‌چنین در میزان حلالیت مواد مغذی تاثیرگذار می‌باشند (Lin و همکاران، ۲۰۱۰). براساس نوع میکروارگانیسم pH بهینه متفاوت است. برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند *Mycobacterium sp.* در pHهای اسیدی به‌دلیل نفوذ بیش‌تر ترکیبات حلقوی به‌داخل آن‌ها عملکرد بهتری دارند (Kim و همکاران، ۲۰۰۵)، اگرچه برخی از میکروارگانیسم‌های متعلق به جنس *Pseudomonas*، pHهای خنثی را برای تجزیه مواد آلی ترجیح می‌دهند. در مطالعه حاضر سویه خالص شده بهترین رشد را در pH ۷/۵ نشان داد و در pHهای اسیدی رشد بسیار کمی را دارا بود که نشان‌دهنده ترجیح pHهای تا حدی بازی برای این گونه است. مطالعه انجام شده توسط Leahy و Colwell (۱۹۹۰) نیز نشان داد است که pH بهنیه برای اغلب باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در حدود ۷ می‌باشد که نتایج این تحقیق نیز تائیدکننده نتایج این محققین است.

پس از به‌دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای مورد نظر pH ۷ /۵ و درصد مولی ۱۰۰:۱۰ به‌عنوان مقادیر بهینه در نظر گرفته شدند. پس از یافتن مقادیر pH و نیتروژن بهینه تعیین میزان حذف نفتالین توسط *Marinobacter aquaeolei* به صورت روزانه اندازه‌گیری شد که نتایج نشان داد، به‌دست آوردن شرایط بهینه فاکتورهای مذکور می‌تواند حذف زیستی نفتالین را در محیط دارای Tween-۸۰ در حدود ۲۵ درصد (در پایان روز ۷) بهبود بخشد. تطبیق نتایج با مدل درجه اول نیز موید آن بود که از این مدل می‌توان جهت تخمین میزان حذف نفتالین در محیط کشت استفاده کرد، البته برای تعیین قطعیت این مدل نیاز به آن است از غلظت‌های مختلف نفتالین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از شرکت نفت و گاز پارس به‌دلیل مساعدت‌های آن‌ها در سفر به منطقه و حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود. هم‌چنین از آقای محمد یعقوبی که در مراحل انجام کار و نگارش مقاله صمیمانه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **Bamforth, S.M. and Singleton, I., ۲۰۰۵.** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. J Chem Technol. ۸۰: ۷۲۳-۷۳۶.

۲. **Bouchez, M.; Blanchet, D. and**

Vandecasteele, J.P., ۱۹۹۵. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations inhibition phenomena and cometabolism. Applied Microbiology and Biotechnology. ۴۳: ۱۵۶-۱۶۴.

۳. **Breedveld, G.D. and Sparrevik, M., ۲۰۰۰.** Nutrient limited biodegradation of PAHs in various soil strata at a creosote contaminated site. Biodegradation. ۱۱: ۳۹۱-۳۹۹.

۴. **Burns, K.A.; Codi, S. and Duke, N.C., ۲۰۰۰.** Australia Field Studies: Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh Sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. Marine Pollution Bulletin. ۴۱: ۳۹۲-۴۰۲.

۵. **Chen, J.; Wong, M.H.; Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y., ۲۰۰۸.** Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas sp.* a bacterial strain isolated from mangrove sediment. Marine Pollution Bulletin. ۵۷: ۶۹۵-۷۰۲.

۶. **Feijoo-Siota, L.; Rosa-Dos-Santos, F.; de Miguel, T. and Villa, G., ۲۰۰۸.** Biodegradation of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* in marine environments: testing cells entrapment in calcium alginate for use in water detoxification. Bioremediation Journal. Vol. ۷, No. ۲, pp. ۱۸۵-۱۹۲.

۷. **Gao, W.; Cui, Z.; Li, Q, Xu.G.; Jia, X.; Zheng, L., ۲۰۱۳.** *Marinobacter nanhaiticus sp*. polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China Sea. Antonie Van Leeuwenhoek. ۱۰۳: ۴۸۵-۴۹۱.

۸. **Ghosh, M.M.; Yeom, I.T.M.; Shi, Z.C.C. and Robinson, K.G., ۱۹۹۵.** Microbial Processes for Bioremediation: Battelle Press, Columbus., OH, USA.

۹. **Grimberg, S.J.; Stringfellow, W.T. and Aitken, M.D., ۱۹۹۶.** Quantifying the biodegradation of phenanthrene by Pseudomonas stutzeri P۱۶ in the presence of a nonionic surfactant. Applied and Environmental Microbiology. ۶۲: ۲۳۸۷-۲۳۹۲.

۱۰. **Haritash, A.K; Kaushik, C.P., ۲۰۰۹.** Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). A review. Journal of hazardous materials. ۱۶۹: ۱-۱۵

۱۱. **Hwang, G.; Park, S.R.; Lee, C.H.; Ahn, I.S.; Yoon, Y.J. and Mhin, B.J., ۲۰۰۹.** Influence of naphthalene biodegradation on the adhesion of *Pseudomonas putida* NCIB ۹۸۱۶-۴ to a naphthalene-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials. Vol. ۱۷۲, No. ۱, pp. ۴۹۱-۴۹۳.

۱۲. **Kim, Y.H.; Freeman, J.P.; Moody, J.D.; Engesse, K.H. and Cerniglia, C.E., ۲۰۰۵.** Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-۱. Applied and Environmental Microbiology. Vol. ۶۷, No. ۲, pp.۲۷۵–۲۸۵.

۱۳. **Laha, S. and Luthy, R.G., ۱۹۹۱.** Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil water systems. Environmental Science and Technology. ۲۵: ۱۹۲۰-۱۹۳۰.

۱۴. **Launen, L.A.; Buggs, V.H.; Eastep, M.E.; Enriquez, R.C.; Leonard, J.W. and Blaylock, M.J., ۲۰۰۲.** Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon-contaminated sediments in aerated bioslurry reactors. Bioremediation Journal. Vol. ۶, No. pp. ۱۲۵-۱۴۱.

۱۵. **Leahy, J.G. and Colwell, R.R., ۱۹۹۰.** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. ۵۴: ۳۰۵-۳۱۵.

۱۶. **Leys, N.M.; Bastiaens, L.; Verstraete, W. and Springael, D., ۲۰۰۵.** Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. Applied Microbiology and Biotechnology. ۶۶: ۷۲۶-۷۳۶.

۱۷. **Li, C.H.; Zhou, H.W.; Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y., ۲۰۰۹.** Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. Sci Total Environ. ۴۰۷: ۵۷۷۲-۵۷۷۹.

۱۸. **Lin, C.; Gan, L. and Chen, Z.L., ۲۰۱۰.** Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). Journal of Hazardous Material. ۱۸۲: ۷۷۱-۷۷۷.

۱۹. **Liu, H.J.; Yang, C.Y.; Tian, Y.; Lin, G.H. and Zheng, T.L., ۲۰۱۰.** Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR–RFLP. Marine Pollution Bulletin. Vol. ۶۰, ۱۱, ۲۰۵۶-۲۰۶۱.

۲۰. **Liu, Y.; Zhu, L. and Shen, X., ۲۰۰۱.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in

۲۱. **Melcher, R.J.; Apitz, .S.E. and Hemmingsen, B.B., ۲۰۰۲.** Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. Appl Environ Microbiol. ۶۸: ۲۸۵۸–۲۸۶۸.

۲۲. **Nguyen, B.H.; Ewald, B.M.D.; Dang, T.C.H.; Gerhard, W. and Helga, S.L., ۱۹۹۹.** *Marinobacter aquaeolei sp.* a halophilic bacterium isolated from Vietnamese oil producing well. lnternational Journal of Systematic Bacteriology. lnternational Journal of Systematic Bacteriology. ۴۹: ۳۶۷-۳۷۵.

۲۳. **Preuss, R.J.A. and Drexler, H., ۲۰۰۳.** Naphthalene an environmental and occupational toxicant. Int Arch Occup Environ Health. ۷۶: ۵۵۶-۵۷۶.

۲۴. **Saponaro, S.; Bonomo, L.; Petruzzelli, G.; Romele, L. and Barbafieri, M., ۲۰۰۲.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry phase bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil. Water, Air and Soil Pollution. ۱۳۵: ۲۱۹-۲۳۶.

۲۵. **Schlegel, H.G., ۱۹۹۲.** Allgemeine Mikrobiologie: Auflage, Georg Thieme Verlag.

۲۶. **Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S., ۲۰۰۸.** Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin. ۵۷: ۷۱۶-۷۲۶.

۲۷. **Tian, Y.; Liu, H.J.; Zheng, T.L.; Kwon, K.K.; Kim, S.J. And Yan, C.L., ۲۰۰۸.** PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. Marine Pollution Bulletin. ۵۷: ۷۰۷-۷۱۵.

۲۸. **Volkering, F.; Breure, A.M.; Van Andel, J.G. and Rulkens, W.H., ۱۹۹۵.** Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. ۶۱: ۱۶۹۹-۱۷۰۵.

۲۹. **Wilson, S.C. and Jones, K.C., ۱۹۹۳.** Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (Pahs). A review. Environ Pollut. ۸۱: ۲۲۹-۲۴۹.

۳۰. **Wu, Y.R.; Luo, Z.H. and Vrijmoed, L.L.P., ۲۰۱۰.** [a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. Bioresource Technology. ۱۰۱: ۹۶۶۶-۹۶۷۲.

۳۱. **Zeinali, M.; Vossoughi, M. and Ardestani, S.K., ۲۰۰۸.** Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH۱, a moderately thermophilic microorganism. Chemosphere. Vol. ۷۲, No. ۶, pp. ۹۰۵-۹۰۹.

۳۲. **Zhou, H.W.; Guo, C.L.; Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y., ۲۰۰۶.** Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. FEMS Microbiology Letters. ۲۶۲: ۱۴۸-۱۵۷.

indoor and outdoor air of Hangzhou, China Environmental Science and Technology. ۳۵: ۸۴۰-۸۴۴.