



دانشگاه گوارن کشاورزی و منابع طبیعی گوارن

نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک

جلد بیست و دوم، شماره پنجم، ۱۳۹۴

<http://jwsc.gau.ac.ir>

## ارزیابی پارامترهای مختلف بر تجزیه آنتراسن توسط باسیلوس جدا شده از رودخانه بابلرود استان مازندران

معصومه ساسانی<sup>۱</sup>، شهرزاد خرم‌نژادیان<sup>۲</sup> و رضا صفری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه محیط زیست، واحد دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی، دماوند، ایران، آستادیار گروه محیط زیست،

واحد دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی، دماوند، ایران، <sup>۲</sup>مربی پژوهشی گروه بیوتکنولوژی آبیان، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی ترکیبات نفتی بوده که باعث آلودگی اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. آلاینده‌های نفتی بر محیط‌های آبی و خاک اثر گذاشته و سبب تغییراتی نامطلوب در آن‌ها می‌گردند. آلاینده‌های نفتی حاوی فلزات سنگین و ترکیبات خطرناک می‌باشند و اثرات زیانباری بر سلامت اکوسیستم‌ها و موجودات زنده خواهند داشت. هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (PAHs) از مهم‌ترین مشتقات نفتی بوده که عموماً در اثر فعالیت‌های انسانی ایجاد شده و دارای پایداری بسیار بالایی بوده و دارای عوارض جانبی متعدد (سرطان‌زا و جهش‌زا) می‌باشند. آنتراسن یک ترکیب سه‌حلقه‌ای آروماتیک بوده که در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی وجود دارد. آنتراسن در بین ۱۰۰ ترکیب آروماتیک جزء سمی‌ترین ترکیبات آروماتیک بوده و کاهش آن از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. برخی از باکتری‌های محیطی از ترکیبات آروماتیک به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آن را به ترکیبات دیگر تبدیل کرده و محصول نهایی تجزیه نیز دی‌اکسیدکربن و آب می‌باشد. آنتراسن به‌علت حلالیت پایین در آب کم‌تر تحت تأثیر مستقیم تجزیه میکروبی قرار گرفته و بایستی شرایط زیستی و غیرزیستی جهت تجزیه را بهینه کرده تا تجزیه میکروبی بیش‌ترین راندمان را داشته باشد. باکتری‌های جنس باسیلوس به‌علت داشتن اسپور، قادر به رشد در شرایط نامناسب زیست‌محیطی بوده و از گونه‌های مختلف باسیلوس به‌طور گسترده در تحقیقات زیست‌فناوری از جمله تولید فرآورده‌های زیستی و کاهش آلاینده‌های زیست‌محیطی استفاده می‌گردد. یکی دیگر از مزایای باسیلوس‌ها، توانایی رشد در محیط‌های ساده و دارای حداقل ماده مغذی بوده و از این‌رو جزء باکتری‌های شاخص جهت کاهش آلاینده‌های زیست‌محیطی می‌باشند. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده (باسیلوس) از مصب رودخانه بابلرود و استفاده از آن‌ها جهت تجزیه زیستی آنتراسن در مقیاس آزمایشگاهی بوده است.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌ها از رسوبات مصب رودخانه اخذ و پس از انتقال به آزمایشگاه، در محیط کشت حداقل (Minimal Salt Medium) MSM کشت داده شدند. یکی از باکتری‌های تجزیه‌کننده آنتراسن جنس باسیلوس بوده

\* مسئول مکاتبه: [khoramnejad@damavandiau.ac.ir](mailto:khoramnejad@damavandiau.ac.ir)

که با استفاده از کشت‌های متوالی جداسازی و از طریق روش‌های مولکولی شناسایی گردید. جهت ارزیابی تجزیه زیستی آنتراسن توسط باسیلوس، از فاکتورهایی نظیر pH، دما و غلظت آنتراسن استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که شرایط بهینه جهت تجزیه آنتراسن شامل  $pH=7/5$ ، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن بوده و با افزایش زمان انکوباسیون، روند تجزیه آنتراسن نیز سریع‌تر صورت گرفت. بازده تجزیه زیستی آنتراسن در حضور باسیلوس، بیش از ۴۰ درصد در طول ۲ بوده که نشان‌دهنده توانایی بالای آنزیمی این باکتری بوده است.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به رشد باسیلوس در شرایط نامناسب (به دلیل اسپوردار بودن) می‌توان از آن به‌عنوان ابزار زیستی جهت حذف آنتراسن استفاده نمود. این روش یک راه‌کار دوست‌دار محیط زیست برای حذف آلاینده‌های پایه نفتی بوده و به دلیل استفاده از عوامل زیستی اثر منفی بر محیط نخواهد داشت. پیشنهاد می‌گردد از این روش در پاک‌سازی محیط‌های آلوده استفاده گردد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتراسن، باسیلوس، رودخانه بابل‌رود، هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک

#### مقدمه

آلودگی اکوسیستم‌های آبی به انواع آلاینده‌های زیست‌محیطی نظیر ترکیبات نفتی، فلزات سنگین، سموم کشاورزی از مهم‌ترین دغدغه‌های مردم می‌باشد. آلاینده‌های مذکور از منابع مختلف نظیر سکوه‌های نفتی و مناطق استخراج نفت، سوخت‌گیری و تردد کشتی‌های نفتی و باربری، پساب کارخانجات صنعتی و شستشوی زمینه‌های آلوده به سموم کشاورزی وارد منابع آبی می‌شوند (7). هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (PAHs) ترکیباتی سرطان‌زا و موتاژن به‌شمار می‌روند (9). این ترکیبات اغلب به‌صورت مخلوط‌های پیچیده در محیط وجود داشته و به‌ندرت به حالت منفرد دیده می‌شوند. رنگ این ترکیبات معمولاً بی‌رنگ تا سفید یا زرد کم‌رنگ بوده و در رنگ‌سازی، ساخت پلاستیک‌ها، آفت‌کش‌ها و آسفالت جاده‌ها به‌کار می‌روند (17). اگر چه برخی از ترکیبات PAHs در شرایط طبیعی توسط جمعیت میکروبی بومی تجزیه می‌شوند ولی این فرآیند معمولاً زمان‌بر بوده (4) و نیاز به استفاده از تکنیک‌هایی با کارایی بالا بوده که قادر به انجام این فرآیند در زمان

کوتاه‌تر باشد. برخی از روش‌های فیزیکی مانند شناورسازی، فاقد کارایی بالا بوده و روش‌های معمول شیمیایی مانند استفاده از مواد سورفاکتانت، معمولاً پرهزینه بوده و دارای محدودیت‌های فراوانی می‌باشند. یکی از روش‌های مؤثر در کاهش این ترکیبات استفاده از روش‌های زیستی بوده که در آن میکروب‌ها به‌صورت منفرد و یا ترکیبی به‌منظور تجزیه کامل ماده آلاینده مورد استفاده قرار می‌گیرند. پژوهش بر روی تجزیه زیستی ترکیبات نفتی نشان داده است که این روش یکی از اقتصادی‌ترین و مؤثرترین روش‌های حذف ترکیبات نفتی از محیط‌های آبی باشد (10). در فرآیند تجزیه زیستی باید از ریزجانداران استفاده گردد که بومی منطقه آلوده بوده و جزء میکروب‌های دستکاری شده نباشند (9). توانایی باکتری‌ها در خاک، آب یا رسوبات به‌منظور تجزیه زیستی PAHs، به پیچیدگی ساختمان شیمیایی ترکیبات و سازگاری باکتری‌های تولیدکننده آنزیم در محیط حاوی ماده آلاینده بستگی دارد. عموماً PAHs دو حلقه‌ای به آسانی قابل تجزیه بوده و باکتری‌های مختلف قادر به تجزیه این گونه ترکیبات

**نمونه برداری:** در این مطالعه از رسوبات بستر مصب رودخانه بابلرود استان مازندران به عنوان محیط جداسازی باکتری استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از ابزار گِرپ از رسوب رودخانه بابلرود در چندین نقطه از منطقه مصب انجام گرفت. به منظور جلوگیری از مرگ باکتری‌ها در رسوب، نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی ریخته شده و در کوتاه‌ترین زمان و دمای پایین به آزمایشگاه انتقال داده شد.

**دستیابی به نمونه خالص باکتری تجزیه کننده آنتراسن:** برای جداسازی باکتری مورد نظر با استفاده از ویژگی‌های مطلوب به عنوان عامل انتخاب کننده، عموماً از محیط کشت حداقل حاوی ترکیب آلاینده شاخص استفاده می‌شود. برای این منظور، پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و تهیه رقت‌های متوالی، کشت در محیط حداقل MSM انجام گرفت. ترکیب محیط کشت در جدول ۱ آمده است.

بوده و از آن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (15). فرآیند تجزیه در ترکیبات دارای حلقه‌های بنزنی بیش‌تر به سختی صورت گرفته و فقط باکتری‌های دارای آنزیم‌های شاخص قادر به انجام این فرآیند می‌باشند. آنتراسن از جمله ترکیبات سه حلقه آروماتیک بوده که کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به این که مطالعات کمی بر روی باکتری‌های بومی ناحیه خزری در شمال ایران انجام گرفته هدف از این مطالعه تجزیه زیستی هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک (آنتراسن) توسط باکتری *Bacillus spp* جدا شده از رسوبات بستر مصب رودخانه بابلرود و شناسایی متابولیت‌های ثانویه ناشی از تجزیه با استفاده دستگاه GC-MS بوده است.

### مواد و روش‌ها

همه آزمایش‌ها بر اساس روش بیان شده در کتاب روش‌های استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب (1998) انجام شد (2). همه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت MSM.

Table 1. Compositions of MSM medium.

گرم در لیتر (g L <sup>-1</sup> )	ترکیبات (Ingredients)
2	آمونیم سولفات Ammonium Sulfate
2	سولفات منیزیم هپتا هیدرات Magnesium Sulfate Heptahydrate
0.01	کلسیم کلراید دی هیدرات Calcium Chloride Dihydrate
0.001	فرو سولفات هپتا هیدرات Ferrous Sulfate Heptahydrate
1.5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O
1.5	مونو پتاسیم فسفات Mon Potassium Phosphate

تجزیه‌کننده آنتراسن، نسبت به کشت مجدد و خالص‌سازی کلنی‌های شاخص اقدام گردید (7, 13).

جهت شناسایی مولکولی باکتری جدا شده، از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) استفاده گردید (15). پرایمرهای Forward و Reverse استفاده شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۲ نشان داده شده است (6). استخراج DNA باکتری طبق روش سمایی و همکاران (2013)، انجام شده و واکنش زنجیره پلیمرز طی ۳۰ سیکل تکرار شد (14).

پس از تنظیم pH در محدوده ۷، فرآیند استریل در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شده و پس از رساندن دمای محیط کشت به ۵۰ درجه، آنتراسن استریل شده با صافی میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون، به‌عنوان تنها منبع کربن به مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، اضافه شد. پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه و رشد باکتری‌های کشت داده (ظاهر شدن کدورت)، متعاقباً کشت در محیط MSM آگاردار دارای آنتراسن انجام گرفته و نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از رشد کلنی‌های

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR.

Table 2. The primers used for PCR examination.

توالی (sequence)	پرایمر (primer)
(5'-CCAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')	Forward primers
(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')	Reverse primers

باکتریایی، ابتدا کشت اولیه باکتری در محیط کشت TSB<sup>۳</sup> انجام شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه، محیط کشت در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب باقیمانده ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شده و مجدداً سانتریفوژ انجام شده و این فرآیند سه مرتبه تکرار شد. در مرحله آخر به رسوب باقیمانده ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد و پس از مخلوط کردن، کدورت سوسپانسیون با کدورت لوله‌های استاندارد مک‌فارلند (۰/۵ مک‌فارلند معادل ۱۰<sup>۸</sup> × ۱/۵ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) مقایسه شد (13).

تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) محصول PCR: برای هر یک از نمونه‌ها مقدار ۳۰ میکرولیتر محصول PCR به همراه پرایمرهای Forward و Reverse هر کدام به مقدار ۲۰ میکرولیتر و غلظت ۲۰ میکرومول در تیوپ‌های جداگانه برای تعیین توالی به شرکت BIONEER کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی به روش سانگر<sup>۱</sup> و تطبیق (BLAST) در ژن بانک<sup>۲</sup> NCBI، باکتری مجهول شناسایی شد (14).

آماده‌سازی باکتری جهت تلقیح به محیط مایع به منظور ارزیابی روند تجزیه: جهت آماده‌سازی تلقیح

3- Tryptic Soy Broth

1- Sanger  
2- National Center for Biotechnology Information

آزمایش‌های PCR نیز جنس باسیلوس را تأیید کرد. نتایج ژل الکتروفورز انجام شده در شکل ۱ نشان داده شده است. در ستون ۱ از سمت چپ مارکر Ladder قرار داشته، ستون ۲ بلانک یا شاهد و ستون‌های ۳ و ۴ نیز نمونه مجهول باکتری قرار داشته است. توالی شناسایی شده جهت بلاست در NCBI شامل سکانس:

```
TCTCTCTCAGGTGGGGTCGAGCGGACG
GCTAAGGAGCTTGTTCCTTACCGACA
ACGTCATACGGCGGGTAACATGTGTA
AGAGATACCTATAAGATCTTTTACTTT
TCAACCAAACCGGAGCTAATGTTATAT
AACATTTGGAACCGGTTGCCGAAAAT
ATTAAGATGTTTTTGCTATCTCTTATAC
ATGGACCCCCCGTCCGCCCTAGTTG
TCAAGGGAACAAGCTTACTTATGCGTT
CATTGACTTCGACCTGAGAGGGTGAT
CGCCCACACTGGAAGTGAAGCA
```

بوده که در نهایت باکتری مورد نظر باسیلوس با شماره دستیابی KP338616.1 بوده است.

**بررسی تأثیر غلظت اولیه آنتراسن بر راندمان حذف:** نتایج جدول‌های ۳ و ۴ بیانگر آن است که افزایش غلظت آنتراسن باعث کاهش روند رو به رشد باسیلوس شده و از طرف دیگر میزان کاهش آنتراسن در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، بسیار بطئی بوده است. تغییرات مشاهده شده در تعداد باکتری‌ها و همچنین غلظت آنتراسن در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار بوده است ( $P < 0.05$ ).

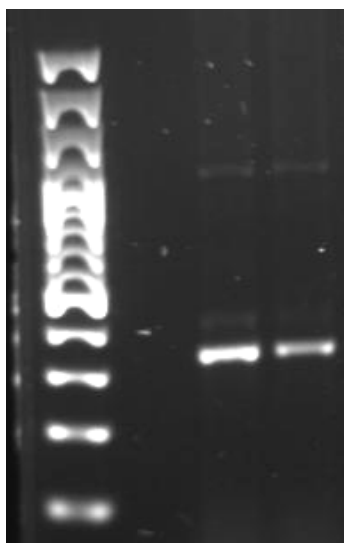
**تجزیه زیستی آنتراسن در محیط مایع:** آزمایش تجزیه زیستی آنتراسن در ارلن‌مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM برات حاوی آنتراسن به‌عنوان تنها منبع کربن انجام گرفت. پارامترهای مورد نظر شامل غلظت آنتراسن (ppm)، (۱۵۰، ۲۰۰)، زمان انکوباسیون (۰، ۲۴، ۴۸ ساعت)، pH (۷/۶، ۵/۵) و دما (۲۵، ۳۵) بوده و با استفاده از پارامترهای مذکور، روش مورد استفاده بهینه‌سازی شدند. نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شده و جهت ارزیابی روند رشد باکتری از محیط کشت تریپتیک سوی آگار استفاده شده و تعداد کلنی‌ها با احتساب رقت مورد استفاده تعیین گردید. جهت بررسی غلظت باقیمانده آنتراسن پس از تجزیه توسط باکتری از دستگاه HPLC<sup>۱</sup> (آلمان KNAUER) استفاده شد (۴). حلال‌های استونیتریل و آب به نسبت ۹۰ به ۱۰ به‌عنوان فاز متحرک با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، ستون C18 و دتکتور UV مورد استفاده قرار گرفتند. همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گردید (۱۲).

**تجزیه و تحلیل آماری:** به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ استفاده شده و جهت ارزیابی نتایج به‌دست آمده، از آنالیز واریانس دوطرفه و دانکن استفاده شده و ارزش P با ضریب اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید.

## نتایج

**باکتری جدا شده:** تست‌های اولیه بیوشیمیایی نشان داد که باکتری جدا شده باسیل گرم مثبت اسپوردار، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بوده و نتایج

1- High-performance liquid chromatography



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز برای نمونه‌های باکتری به همراه مارکر Ladder.

Figure 1. The results of gel electrophoresis for bacteria samples and also ladder marker.

جدول ۳- لگاریتم تعداد باسیلوس spp در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن.

Table 3. Logarithm of *Bacillus spp* count in 150 ppm and 200 ppm of Anthracene.

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
200 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	
6.65 ±0.2 aC	6.58 ±0.33 aC	0
8.01 ±0.11 bB	8.28 ±0.07 aB	24
8.68 ±0.25 bA	9.21 ±0.14 aA	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد (P<0.05).

Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

جدول ۴- تغییرات غلظت آنتراسن در حضور *Bacillus spp*.

Table 4. Changes of Anthracene in presence of *Bacillus spp*.

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
200 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	
200 ±4.25 A	150 ±1.45 A	0
174 ±4.89 B	133 ±3.26 B	24
168 ±2.30 C	89 ±4.11 C	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد (P<0.05).

Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

بررسی تأثیر pH اولیه بر راندمان حذف: با توجه به این که در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر، تجزیه باکتریایی بهتر انجام گرفته از این رو غلظت بهینه جهت آزمایش های بعدی، ۱۵۰ در نظر گرفته شد. نتایج جدول های ۵ و ۶ نشان دهنده تجزیه بهتر آنتراسن در pH=۷/۵ در مقایسه با pH=۶/۵ می باشد.

جدول ۵- لگاریتم تعداد باسیلوس spp در pH های ۶/۵ و ۷/۵ و غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر از آنتراسن.

**Table 5. Logarithm of *Bacillus spp* count in pH=6.5 and pH=7.5 and 150 ppm of Anthracene.**

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
pH=7.5	pH=6.5	
6.61 ±0.08 aC	6.58 ±0.12 aC	0
8.45 ±0.07 aB	8.28 ±0.05 bB	24
9.29 ±0.24 aA	9.15 ±0.31 bA	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵).

Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

جدول ۶- تغییرات غلظت آنتراسن (۱۵۰ میلی گرم در لیتر) در حضور باسیلوس spp در pH های ۶/۵ و ۷/۵.

**Table 6. Changes of 150 ppm of Anthracene in presence of *Bacillus spp* and pH=6.5 and pH=7.5.**

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
pH=7.5	pH=6.5	
150 ±1.11 aA	150 ±1.21 aA	0
125 ±4.17 aB	127 ±3.45 aB	24
82 ±3.26 aC	85 ±2.36 aC	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵).

Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

تغییرات مشاهده شده در تعداد باکتری و غلظت ۱۵۰ آنتراسن در هر دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).

بررسی تأثیر دما بر راندمان حذف: نتایج تأثیر دما بر روند تجزیه آنتراسن در جدول های ۷ و ۸ نشان داده شده است. بیشترین تجزیه آنتراسن در دمای انکوباسیون ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شده است.

جدول ۷- لگاریتم تعداد باسیلوس spp در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در pH=۷/۵ و غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتراسن.

**Table 7. Logarithm of *Bacillus spp* count in 25 °C and 35 °C, pH=7.5 and 150 ppm of Anthracene.**

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
35 °C	25 °C	
6.58 ±0.04 aC	6.65 ±0.97 aC	0
8.76 ±0.08 aB	8.27 ±0.04 bB	24
9.53 ±0.31 aA	9.22 ±0.22 bA	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

جدول ۸- تغییرات غلظت آنتراسن (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در حضور باکتری باسیلوس spp در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵.

**Table 8. Changes of 150 ppm of Anthracene in presence of *Bacillus spp*, pH=7.5 and 25 °C and 35 °C.**

باسیلوس spp <i>Bacillus spp</i>		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)
35 °C	25 °C	
150 ±1.34 aA	150 ±1.45 aA	0
114 ±3.29 bB	125 ±2.12 aB	24
80 ±2.32 aC	82 ±3.25 aC	48

حروف متفاوت در ستون و ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار ما بین داده‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

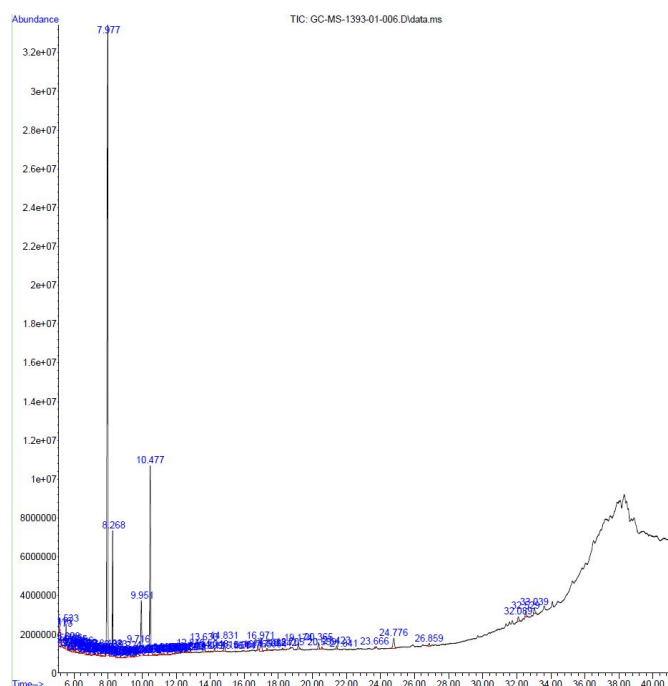
Different letters in columns and rows represent mean value at P<0.05 level.

آن پیک‌های کاتکول و فتالات مشاهده می‌شوند. متابولیت‌های مذکور، جزء مواد حد واسط انتهایی بوده که نشان‌دهنده تجزیه نسبتاً کامل آنتراسن توسط باسیلوس جدا شده می‌باشد. در شکل ذیل متابولیت‌های بسیار متنوعی تولید می‌شوند که مقادیر آن‌ها بسیار پایین بوده و سریعاً تحت‌تأثیر تجزیه میکروبی قرار گرفته و به متابولیت بعدی تبدیل می‌شوند. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به آنتراسن سیس ۱ و ۲ دی‌هیدروکسی دی ال، ۱ و ۲ دی‌هیدروکسی آنتراسن، سیس ۴ و ۲ اوکسوبات اکوئیک اسید و ... اشاره نمود.

بررسی راندمان حذف در شرایط بهینه: با توجه به نتایج ارائه شده، بهترین شرایط جهت تجزیه آنتراسن pH=۷/۵، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنتراسن ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنتراسن بوده است. در چنین شرایطی، راندمان حذف بیش از ۴۰ درصد بوده است.

شناسایی متابولیت‌های ثانویه ناشی از تجزیه آنتراسن: در شکل ۲، متابولیت‌های مختلف که به دنبال تجزیه زیستی آنتراسن تولید می‌شوند نشان داده شده است. بیش‌ترین پیک متابولیت‌های حاصله مربوط به ۲ و ۳ دی‌هیدروکسی نفتالن بوده و پس از





شکل ۲- طیف جذبی دستگاه GC-MS.  
Figure 2. Absorption spectrum of GC-MS.

چهار جنس از باکتری‌ها را از ریزوفر پاپلوس دلتوئیدس جدا کردند که قادر به تجزیه ترکیبات نفتی بوده و جنس‌های شاخص شامل کورتیا، میکروکوکوس، دینوکوکوس و باسیلوس بودند (16). در تمامی مطالعات مورد اشاره، جنس باسیلوس از جنس‌های غالب بوده که قادر به رشد در شرایط مختلف بوده و گونه‌های مختلف آن قادر به تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند. این باکتری‌ها به لحاظ تولید آنزیم‌های مختلف و اسپوردار بودن از پتانسیل بسیار بالایی در جهت کاهش آلاینده‌های مختلف زیست‌محیطی برخوردار می‌باشند.

**بررسی تأثیر غلظت اولیه آنتراسن بر راندمان حذف:** نتایج نشان‌دهنده آن است که با افزایش غلظت آنتراسن روند تجزیه نیز کندتر می‌شود علت این امر سمیت PAHs در غلظت‌های بالا برای باکتری‌ها می‌باشد (8). مشرام و ویت (2014) گزارش کردند که باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک‌های آلوده به

باکتری جدا شده: در مطالعه‌ای که توسط مشرام و ویت (2014) انجام گرفت یکی از باکتری‌های شاخص که از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در منطقه ناگپور هند جدا شد باسیلوس سرئوس بوده که قادر به تجزیه غلظت‌های بالای آنتراسن (تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بوده است (11). در مطالعه انجام شده توسط آنویلر و همکاران (2000) به گونه‌های مختلف باسیلوس شامل ترمولورانس، سرئوس و ویرتی که قادر به تجزیه آنتراسن و نفتالن در غلظت‌های متفاوت می‌باشند اشاره شد (3). پراکاش و همکاران (2014) گزارش کردند که جنس‌های باسیلوس، سودوموناس و میکروکوکوس از جنس‌های غالب جدا شده از مناطق آلوده به مواد نفتی بوده که قادر به تجزیه بنزن، تولوئن، آنتراسن، نفتالن و گازوئیل بوده و به هنگامی که به صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند بیش‌ترین کاهش در غلظت ترکیب نفتی رخ می‌دهد (12). سودها و همکاران (2010)

ترمولوورانس قادر به تجزیه نفتالن و آنتراسن در  $pH=7$  و دمای نسبتاً بالا بوده و شرایط رشد و تکثیر آن در شرایط ذکر شده بهتر بوده و از بین دو ترکیب نفتالن و آنتراسن، نفتالن سریع‌تر تحت فرآیند تجزیه قرار می‌گیرد (3).

**بررسی تأثیر دما بر راندمان حذف:** در مطالعه انجام شده توسط مشرام و ویت (2014) مشخص گردید که باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک آلوده قادر به تجزیه آنتراسن در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه با درصدهای ۴۶/۸، ۵۹/۶ و ۶۴ درصد در زمان ۸ روز بوده که نشان‌دهنده راندمان بالای تجزیه در دمای ۳۵ درجه بوده است که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (11). مطالعه آنویلر و همکاران (2000) نشان داد که باسیلوس ترمولوورانس قادر به تجزیه نفتالن و آنتراسن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بوده و از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند. باکتری‌های مختلف بسته به ماهیت گرمادوست، سرمادوست و مزوفیل بودن قادر به رشد و تکثیر در دماهای مختلف بوده و دارای دماهای مینیمم، ماکزیمم و اپتیمم جهت رشد می‌باشند (3).

**بررسی راندمان حذف در شرایط بهینه:** مطالعات انجام گرفته توسط سایر پژوهشگران نیز تأییدکننده نتایج حاضر بوده و در اکثر موارد  $pH=7/5$  و دمای ۳۵ درجه بهترین شرایط را برای رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده فراهم کرده به طوری که برخی از گونه‌های باکتریایی در چنین شرایطی، قادر به سازگاری خود با غلظت‌های بالاتر ترکیب نفتی بوده و در نهایت آن را تجزیه می‌نمایند. زمان انکوباسیون مورد نظر در سایر مطالعات بین ۶ تا ۱۰ روز و یا حتی بیشتر بوده در صورتی که در مطالعه حاضر ۲ روز بوده ولی با این وجود، راندمان حذف آنتراسن در طول ۲ روز بیش‌تر از ۴۰ درصد بوده که نشان‌دهنده توانایی بسیار بالای باسیلوس جدا شده می‌باشد.

مواد نفتی در منطقه ناگپور هند، قادر به تجزیه غلظت‌های بالای آنتراسن (تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بوده است. توانایی تجزیه باکتری در تجزیه ترکیب نفتی به جنس و گونه باکتری، توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه (که این فرآیند حتی در گونه‌های مختلف یک جنس از باکتری متفاوت می‌باشد) و در نهایت زمان انکوباسیون بستگی دارد (11). در مطالعه حاضر زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت بوده که زمان نسبتاً کمی جهت باکتریایی بوده و باکتری نیاز بیش‌تری جهت آدپتاسیون با شرایط حاضر و در نتیجه تجزیه بیش‌تر ترکیب نفتی داشته در صورتی که زمان در نظر گرفته شده در مطالعه مشرام و ویت (2014) ۱۰ روز بوده است. باسیلوس جدا شده در مطالعه حاضر قادر به تجزیه آنتراسن در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در طول ۴۸ ساعت بوده و تا بیش از ۴۰ درصد آنرا کاهش داده است. در صورتی که در مطالعه دیگران، در زمان ۶ تا ۱۰، راندمان تجزیه بین ۵۵ تا ۶۵ درصد بوده است (3, 11, 16). بنابراین انتظار بر این است که با افزایش زمان انکوباسیون، روند تجزیه آنتراسن توسط باسیلوس ارتقاء خواهد یافت.

**بررسی تأثیر  $pH$  اولیه بر راندمان حذف:** در مطالعه انجام شده توسط مشرام و ویت (2014) مشخص گردید که باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک آلوده قادر به تجزیه آنتراسن در  $pH$  های ۶/۵، ۷ و ۷/۵ با درصدهای ۵۸/۴، ۶۰ و ۶۳ درصد در زمان ۸ روز بوده که نشان‌دهنده راندمان بالای تجزیه در  $pH=7/5$  بوده است که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (11). راندمان تجزیه در مطالعه حاضر بیش از ۴۰ درصد بوده که در طول ۴۸ ساعت رخ داده است. اکثر باکتری‌های زیست‌محیطی دارای فعالیت اپتیمم در  $pH=7/5$  بوده اگرچه در  $pH$  های پایین‌تر و یا بالاتر قادر به رشد و تکثیر می‌باشند. مطالعه آنویلر و همکاران (2000) نشان داد که باسیلوس

تحت تأثیر تجزیه باکتریایی، به متابولیت‌های ثانویه بیشتر و در نهایت کاتکول تبدیل شده که متفاوت از راه متابولیکی فتالات می‌باشد (5).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باسیلوس جدا شده از رسوبات مصب رودخانه بابل رود، پتانسیل و قدرت تجزیه آنتراسن را دارا بوده و در شرایط اپتیمم از نظر دما و pH، قادر به حذف بیش از ۴۰٪ از آنتراسن در محیط کشت آزمایشگاهی می‌باشد، بنابراین با انجام آزمایشات تکمیلی تجزیه زیستی سایر ترکیبات آروماتیک توسط این باکتری و دستیابی به نتایج مستدل، می‌توان از این جنس، به جهت بومی بودن در شرایط آب و هوایی مازندران، جهت پاک‌سازی لکه‌های نفتی در مناطق آلوده استفاده نمود.

شناسایی متابولیت‌های ثانویه ناشی از تجزیه آنتراسن: در مطالعه انجام شده توسط مشرام و ویت (2014) در خصوص تجزیه آنتراسن توسط باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک آلوده نیز به چنین ترکیبات حدواسط ناشی از تجزیه زیستی اشاره شده است (11). در مطالعه انجام شده توسط سرنیگلیا (1984)، متابولیت‌های مختلف ناشی از تجزیه زیستی ترکیبات آروماتیک حلقوی مورد بررسی قرار گرفته و از نظر کمی و کیفی مورد مقایسه قرار گرفتند (7). وجود فتالات در هنگام تجزیه نشان‌دهنده آن است که باکتری از طریق راه متابولیکی فتالات عمل کرده و آنتراسن را به فتالات تبدیل کرده است. در این روش، تعداد متابولیت‌های تولید شده پایین می‌باشد (1). وجود کاتکول نشان‌دهنده آن است که آنتراسن

#### منابع

- Ahmed, T.A., Othman, M.A., Sarwade, V.D., and Gawai, K.R. 2012. Degradation of Anthracene by Alkaliphilic bacteria *Bacillus badius*. *Environment and Pollution*. 1: 2. 97-104.
- American Public Health Association AWWA, Water Environment, Federation. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington DC, Pp: 123-132.
- Annweiler, E., Richnow, H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Franke, W., and Michaelis, W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into biomass by the thermophile *Baillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 518-523.
- Arab, A., and Salim, B. 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Affected by some Lactic Acid Bacteria. *J. Am. Sci.* 10: 6. 1237-1246.
- Bajkic, S., and Vasiljevic, B. 2011. Four *Bacillus* Sp. Soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. *Archives of Biological Science Belgrade*. 63: 4. 1057-1067.
- Barret, M., and Carre, H. 2010. PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge. Do bioavailability and/or cometabolism limit their biodegradation. *Water Res.* 44: 13. 3797-3806.
- Cerniglia, C.E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 31-37.
- Cripps, C., John, A., Steven, B., and Aust, D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 4. 1114-1118.
- Emtiazjo, M., and Sedighi, S. 2009. Bioremediation of anthracene in Siri Island in Persian Gulf. *J. Sci. Environ. Technol.* 11: 3. 258-268.
- Lu, J., Dang, Z., Lu, G., Yang, C., Yi, X., and Guo, C. 2012. Biodegradation Kinetics of Phenanthrene by a Fusant Strain. *Current Microbiology*. 65: 3. 225-230.

11. Meshram, R.L., and Wate, S.R. 2014. Isolation, characterization and Anthracene mineralization by *Bacillus Cereus* from petroleum oil depot soil. *Ind. J. Appl. Res.* 4: 5. 16-18.
12. Prakash, A., Bisht, S., and Singh, J. 2014. Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. *Turk. J. Engin. Environ. Sci.* 38: 41-50.
13. Safari, R., and Yaghobzadeh, Z. 2009. Biodegradation of naphthalene using isolated bacteria from Caspian Sea. *J. Iran Mar. Sci.* 3: 5. 35-46.
14. Samaei, M.R., and Mortazavi, S.B. 2013. Isolation, genetic identification, and degradation characteristics of N- hexadecane degrading bacteria from tropical areas in Iran. *Fresenius Environ. Bull.* 22: 4. 1304-12.
15. Sharon, A., Churchil, L., Jenniffer, P., Harpe, R., and Perry, F. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 2. 52-9.
16. Sudha, M., Sarnya, A., Selvakumr, G., and Sivakumr, N. 2014. Microbial degradation of Azo Dyes: A review. *Int. J. Cur. Micobl. Ap. Sci.* 3: 2. 670-679.
17. Ukiwe, L.N., Egereonu, U.U., and Njoku, P.C. 2013. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review. *Inter. J. Chem.* 5: 4. 44-55.



Gorgan University of Agricultural  
Sciences and Natural Resources

*J. of Water and Soil Conservation, Vol. 22(5), 2016*  
<http://jwsc.gau.ac.ir>

## Evaluation of different parameters on Anthracene biodegradation by *Bacillus Spp* isolated from Babolrood river in Mazandaran province

M. Sasani<sup>1</sup>, \*Sh. Khoramnejadian<sup>2</sup> and R. Safari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Graduate, Dept. of Environmental, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, Iran,

<sup>2</sup>Assistant Prof., Dept. of Environmental, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, Iran,

<sup>3</sup>Instructor, Dept. of Biotechnology, Ecological Academy of Caspian Sea, Sari

Received: 11/19/2015; Accepted: 01/02/2016

### Abstract

**Background and Objectives:** One of the most important environmental pollutants is petroleum compounds that contaminate aquatic ecosystems. Petroleum pollutants affect the aquatic and terrestrial ecosystems and cause adverse change in them. Petroleum pollutants contain heavy metals and hazard compounds and will have harmful effects on the ecosystems and organisms. Aromatic polycyclic hydrocarbons (PAHs) from the oil derivatives, are generally caused by human activity and high stability, and have multiple side effects (carcinogenic and mutagenic). Anthracene, a combination of tricycles aromatic hydrocarbon and exist in contaminated areas. Anthracene is one among the 100 most toxic aromatic compounds and therefore reducing of Anthracene is important. Some of environmental bacteria are used from PAHs as a source of carbon and energy and convert it to the other compounds and final products of degradation are carbon dioxide and water. Anthracene due to low solubility in water is less directly affected by land and microbial degradation in biotic and therefore abiotic conditions must be optimized for microbial degradation to have the greatest efficiency. *Bacillus* is belonging to spore forming bacteria and is able to grow in improper environmental conditions and different species of *Bacillus* are extensively used in biotechnology research, including the production of biological products and reduce environmental pollutants. In other hand, *Bacillus* species are capable to grow in simple environments with minimal nutrient and therefore to reduce environmental pollutants.

**Materials and Methods:** Sampling was done from river estuary sediment and was cultured in Minimal Salt Medium (MSM). *Bacillus Spp.* was one of the isolated bacteria from river sediment that was identified by molecular technique. In next step, influence of pH, temperature and concentration of Anthracene were surveyed on Anthracene biodegradation by *Bacillus spp* during zero, 24 and 48 hours.

**Results:** The results showed that the optimized condition for biodegradation included pH=7.5, 35 °C and 150 ppm of Anthracene. Bacterial degradation of Anthracene was increased with prolong incubation time. Efficiency of *Bacillus sp* for decomposition of Anthracene was 42% during 48 hours.

**Conclusion:** With regards to high potential of *Bacillus* and also its survival in improper condition (spore – forming bacterium) it can be used as biological tools for degradation of Anthracene in oil contaminated regions. This method is an eco-friendly way for removal of petroleum based pollutants and doesn't have a negative effect on the environment. This method is recommended to remediation of petroleum polluted environment.

**Keywords:** Anthracene, Babolrood river, PAHs, *Bacillus Spp*

---

\* Corresponding Author; Email: [khoramnejad@damavandiau.ac.ir](mailto:khoramnejad@damavandiau.ac.ir)

