Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پیرن از خاک‌های اطراف محل‌های دفن زباله در شیراز و بررسی سینتیک رشد آن‌ها

فرشید کفیل زاده[۱*]، فاطمه هوشیاری پور[۱]، راضیه افروغ[۱]، هوشنگ جمالی[۱]، قادر الهوردی[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران.
۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۷/۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: پیرن یکی از هیدروکربن‌های سرطان زا موجود در محیط زیست و یکی از ۱۲۹ آلوده کننده برتر گرد آوری شده به وسیله آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) می‌باشد. امروزه یکی از روش‌های مقرون به صرفه که مورد توجه محققان بسیاری قرار گرفته است، استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه این ترکیبات از محیط زیست، می‌باشد. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی توانمند در تجزیه هیدروکربن پیرن در خاک‌های اطراف مراکز دفن زباله در شیراز و بررسی رشد باکتری‌های جدا شده در حضور غلظت‌های متفاوت ترکیب آلی مذکور می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه برداری از خاک‌های اطراف محل‌های دفن زباله در شیراز انجام و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۶ g/l پیرن و محیط کشت فاقد پیرن شمارش گردید. باکتری‌های جداشده توسط محیط‌های غنی سازی شده با هیدروکربن پیرن جداسازی و با کمک روش‌های استاندارد (ویژگی کلنی، خواص میکروسکوپی، تخمیر قندها و تست‌های بیوشیمیایی) شناسایی شدند. سنتیک رشد باکتری‌های جداسازی شده طی ۷ روز متوالی در فواصل ۱۲ ساعته ارزیابی شد.

نتایج: تعداد باکتری‌ها در محیط بدون پیرن بالاتر از محیط حاوی پیرن گزارش شد (cfu/g). باکتری‌های جدا شده شامل سویه های مایکوباکتریوم، باسیلوس، سودوموناس، میکروکوکوس و مایکوباکتریوم بودند. هر ۴ باکتری جدا شده در حضور ۰/۶ g/l پیرن و در فواصل روزهای سوم و چهارم بهترین رشد را از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: جداسازی باکتری‌های مؤثر در تجزیه پیرن این امکان را فراهم می‌سازد که روش‌های نوین با کارایی بیشتر برای حذف این آلاینده‌های آلی سرطان زا از محیط زیست پدید آید و همچنین از باکتری‌های جدا شده در این تحقیق می‌توان برای بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی مناطق آلوده به پیرن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: تجزیه زیستی، پیرن، مایکوباکتریوم، باسیلوس، کارسینوژن، محل‌های دفن زباله

مقدمه

هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک (PAHs) ترکیباتی کارسینوژن و موتاژن به شمار می‌روند که به طور گسترده‌ای در نتیجه فعالیت‌های انسانی شامل کمپوست کردن سوخت‌های فسیلی و مواد آلی، گدازش زغال سنگ و مراحل تبخیری، اگزوز اتومبیل‌ها، سوزاندن جنگل‌ها، رسوخ نفت توزیع شده‌اند (۱ و ۲). یکی از راه‌های معمول ورود PAHs به بدن به واسطه تنفس هوای آلوده و از طرف دیگر استفاده از آب یا غذای آلوده به PAHs می‌باشد. مطالعات کلنیکی نشان می‌دهد که غلظت بالای یک ترکیب PAH می‌تواند باعث سرطان‌های مختلفی در پوست، شش، معده و کبد شود (۳ و ۴).

پیرن یک هیدروکربن متقارن حاوی چهار حلقه آروماتیک به هم اتصال یافته است و یکی از ۱۲۹ آلوده کننده برتر گرد آوری شده به وسیله آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) است. پیرن خود، یک ترکیب ژنوتوکسیک نیست ولی دارای چهار هسته آروماتیکی است که در چندین PAH کارسینوژن از قبیل بنزوپیرن، ۱و۲و۳ـ ایندنوپیرن و ۱ ـ نیتروپیرن یافت می‌شود (۵). اگر چه پیرن در شرایط طبیعی به وسیله جمعیت میکروبی بومی تجزیه می‌شوند ولی این پروسه‌ها معمولاً زمان بر می‌باشد (۴). در نتیجه نیاز به توسعه تکنیک‌های پاک‌سازی ساده و با صرفه برای خاک‌هایی که با PAHs آلوده شده‌اند امری بدیهی است.

متجاوز از ۲۰ سال گذشته تجزیه زیستی ترویج پیدا کرد و به عنوان یک استراتژی اقتصادی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به PAHs با استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده، مورد استفاده قرار گرفت. پاک‌سازی زیستی نه فقط در تجزیه آلودگی‌ها می‌تواند مؤثر واقع شود بلکه می‌توان از آن برای پاک‌سازی مواد ناخواسته از هوا، خاک، آب، ماده خام از مواد زاید صنعتی استفاده کرد (۱ و ۶).

توانایی باکتری‌ها در خاک، آب یا رسوبات برای تجزیه زیستی PAHs به پیچیدگی ساختمان شیمیایی و مقدار سازگاری آنزیمی به وسیله باکتری‌های بومی در واکنش به فشار شدید به هیدروکربن‌های حلقوی است. عموماً PAHs محتوای دو یا سه حلقه آروماتیک به آسانی قابل

* **نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.
تلفن ۰۷۹۱-۴۴۴۷۰۰۱ Email: Kafilzadeh@jia.ac.ir

تجزیه هستند و باکتری‌های متعددی جداسازی شده‌اند که توانایی استفاده از PAHs با وزن مولکولی پایین به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارند اما PAH های محتوی ۴ حلقه آروماتیک از قبیل پیرن یا تعداد بیشتر حلقه‌های آروماتیک، بسیار سرسخت هستند (۷).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای بر روی تجزیه زیستی در باکتری‌های جدا شده از محیط‌های طبیعی صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۸، چرچیل و همکاران موفق به جداسازی سویه مایکوباکتریوم با توانایی استفاده از هیدروکربن‌های سه و چهار حلقه‌ای شدند (۸). در پژوهش‌های دیگری که با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات سه و چهار حلقه‌ای از قبیل آنتراسن، فنانترن یا پیرن بر روی محیط آبی انجام شد، هو و همکاران توانستند سویه‌های باکتریایی مایکوباکتریوم ساکاروتری، گوردونا و رودوکوکوس را به عنوان باکتری‌های توانمند در تجزیه پیرن جداسازی کنند (۹). همچنین به طور گسترده‌ای در اکوسیستم آبی و خاکی تجزیه هیدروکربن پیرن به وسیله باکتری‌های جدا شده گزارش شد. در مطالعات دیگر توسط چیکوما و همکاران در سال ۲۰۰۰، محصولات متابولیسم ناقص پیرن به وسیله چندین سویه باکتریایی متفاوت مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). از جمله در سودوموناس شتزری P16 و باسیلوس سرئوس P21 پیرن به سیس-۴و۵ دی هیدرو ۴و۵ دی هیدروکسی پیرن (PYRdHD) و در اسفینگوموناس یانوی کویای R1 ، پیرن به پیرن ۴و۵ دیون (PYRQ) و سیس-۴و۵ دی هیدرو ۴و۵ دی هیدروکسی پیرن (PYRdHD) متابولیزه شد. در حالی که هانتر و همکاران در سال ۲۰۰۵، متابولیسم کامل پیرن به آب و دی اکسید کربن توسط سویه باسیلوس سابتیلوس را گزارش کردند (۱۱). شو و همکاران در سال ۲۰۰۴، مایکوباکتریوم S65 را از نواحی آلوده به سوخت جدا کردند (۱۲). در سویه جدا شده با توانایی رشد بر روی پیرن، فنانترن و فلورانتن، یک پلاسمید بزرگ یافت شد. نتایج نشان دادند که پلاسمیدها نقش اساسی در تکامل توانایی تجزیه در بین میکرو ارگانیسم‌ها بازی می‌کنند. آن‌ها به جمعیت‌های باکتریایی اجازه دسترسی به انتقال افقی ژن که ممکن است برای بقای آن‌ها مهم باشد، را می‌دهد (۱۸). امروزه مکانیسم مقاومت به پیرن و پلاسمیدهای مسئول، در باکتری‌ها به خوبی شناخته شده است. در نهایت در سال ۲۰۰۸، توسط چوهان و همکاران استراتژی‌های تجزیه زیستی توسط باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت استفاده از روش تجزیه زیستی از خاک‌های حاوی آلاینده‌های آلی از قبیل پیرن در گام اول، مستلزم جداسازی و شناسایی دقیق باکتری‌های مؤثر و سپس کاربرد آن‌ها برای فرایند پاک‌سازی زیستی می‌باشد (۱۴).

مناطق دفن زباله در محل روستای برمشور در کمتر از ۱۸ کیلومتری شهرستان شیراز قرار دارد که به طور مداوم هیدروکربن پیرن در نتیجه فعالیت‌های انسانی به این محل وارد می‌شود. همچنین ممکن است این هیدروکربن از طریق هوا یا مواد غذایی آلوده به بدن انسان راه یابد و منجر به ایجاد انواع سرطان‌ها در بدن انسان شود. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های مؤثر در تجزیه هیدروکربن پیرن موجود در خاک‌های اطراف محل‌های دفن زباله در شیراز و بررسی میزان رشد آن‌ها در حضور غلظت‌های متفاوت پیرن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: نمونه برداری از خاک ۳ ایستگاه متفاوت در محل‌های دفن زباله (Landfills) در شیراز انجام گردید. نمونه‌های خاک از cm ۱۰-۰ بالای ناحیه شناخته شده جمع آوری و طی ۲۴ ساعت بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد (۱۵).

شمارش کلنی: پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، شمارش کلنی‌ها (هر کلنی معادل یک باکتری می‌باشد) با روش شمارش تعداد کلونی قابل مشاهده (count Total viable eplat) انجام شد. توسط سرم فیزیولوژی از نمونه‌ها رقت‌های سریالی، تهیه و در محیط نوترینت آگار واجد g/l ۰/۶ پیرن و محیط نوترینت آگار بدون پیرن، کشت سطحی داده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت اتوکلاو و سپس تعداد باکتری‌های رشد یافته (cfu/g) بر روی محیط نوترینت آگار شمارش گردید (۱۴).

محیط و شرایط کشت: از محیط (Minimal Basal Salt) (MBS) جهت غنی سازی و انجام آزمایشات بیشتر استفاده شد. در ابتدا با هدف انجام غنی سازی ml ۹۰ از محیط کشت پایه باکتریایی درون فلاسک های ml ۲۵۰ ریخته و سپس حدود gr ۱۰ خاک آلوده به باکتری، به هر فلاسک اضافه و فلاسک ها با g/l ۰/۶ پیرن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی تکمیل شد. محیط غنی سازی شده بر روی شیکر چرخاننده در شرایط تاریکی و در دمای ۳۰°c انکوبه شد. غنی سازی بیشتر باکتریایی طی فرآیند انتقال محیط کشت غنی سازی شده به محیط کشت تازه و اضافه کردن مجدد ماده تلقیحی پیرن به مدت یک ماه با فواصل ۷ روزه انجام گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پیرن: برای آماده سازی از محیط MBS آگار (gr ۲۰ آگار+ یک لیتر محیط)MBS استفاده گردید و با استفاده از تکنیک spray-plate باکتری‌ها روی آن کشت داده شد. پلیت ها در ۳۰° c درجه به مدت ۵-۳ روز انکوبه و کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط‌های بلاد آگار خالص سازی گشت. سویه‌های باکتریایی جدا شده به وسیله تنوعی از واکنش‌های بیوشیمیایی، باکتریولوژیک و آزمون‌های رشد (اکسیداز، کاتالاز، حرکت باکتری، تست‌های قندی از قبیل: تخمیر لاکتوز، سوکروز، گلوکز) شناسایی شدند و تست‌های استاندارد از قبیل رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسید فاست، مورفولوژی و رنگ کلنی به شناسایی آن‌ها کمک کرد (۱۶).

سینتیک رشد: به منظور تعیین منحنی رشد باکتری‌های جدا شده در حضور غلظت‌های متفاوت پیرن از روش سنجش OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای این منظور غلظت های g/l ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ از پیرن تهیه و به محیط کشت پایه معدنی اضافه و در دمای ۳۰°c در شرایط تاریکی انکوبه شد. میزان دانسیته نوری هر کدام از باکتری‌ها در غلظت‌های ذکر شده به مدت ۷ روز با فواصل ۱۲ ساعته و استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ nm خوانده شد و سپس منحنی رشد باکتری‌های جدا شده ترسیم گردید (۷).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده

با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت و مرز معنی داری در سطح $p<0/05$ قرار داده شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پیرن: جنس‌های مختلف باکتریایی از خاک‌های محل دفن زباله جدا شد که همگی رشد خوبی بر روی محیط پایه نمکی از خود نشان دادند. ۴ سویه که بهترین رشد را از خود نشان دادند، مورد شناسایی قرار گرفتند. کلنی‌های آن‌ها طی ۵ ـ ۳ روز بر روی محیط MBS آگار حاوی هیدروکربن پیرن ظاهر گردید که بیانگر توانایی آن‌ها در استفاده از این ماده به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود. سویه‌های جدا شده به عنوان سودوموناس، میکروکوکوس، مایکوباکتریوم و باسیلوس شناسایی شدند.

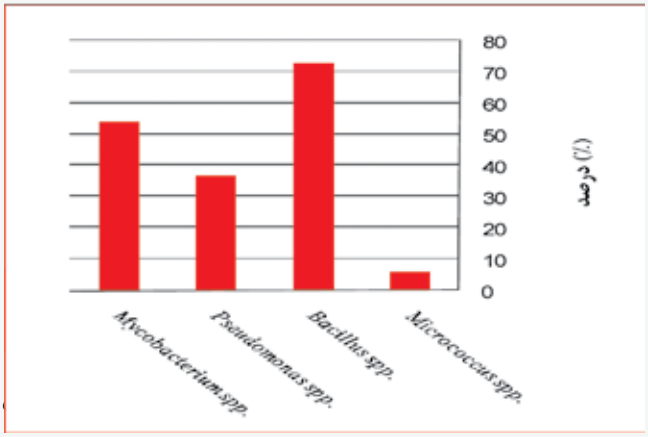
شمارش کلنی‌ها: میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط فاقد پیرن در محل‌های دفن تازه زباله، یک ساله و پنج ساله به ترتیب $۲/۱\times۱۰^{۴}$، $۴/۸\times۱۰^{۴}$، $۵/۴\times۱۰^{۴}$ گزارش شد. در مقایسه ایستگاه‌ها از نظر میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده پیرن، بیشترین تعداد باکتری‌ها $۲/۶\times۱۰^{۴}$ در محل‌های دفن یک ساله زباله و سپس $۲/۰\times۱۰^{۴}$ در محل‌های دفن پنج ساله زباله و کم‌ترین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده پیرن $۱/۹\times۱۰^{۳}$ در محل‌های دفن تازه زباله بدست آمد (جدول شماره ۱).

جدول ۱: مقایسه ایستگاه‌ها از نظر میانگین تعداد باکتری تجزیه کننده پیرن

تعداد باکتری / ایستگاه محل‌های دفن	میانگین تعداد کل باکتری (Cfu/g)	میانگین تعداد باکتری‌های تجزیه کننده پیرن (Cfu/g)	درصد باکتری‌های تجزیه کننده پیرن (٪)
زباله تازه	$۲/۱\times۱۰^{۴}$	$۱/۹\times۱۰^{۳}$	۹/۰۴
زباله یک ساله	$۴/۸\times۱۰^{۴}$	$۲/۶\times۱۰^{۴}$	۵۴/۲۰
زباله پنج ساله	$۵/۴\times۱۰^{۴}$	$۲/۰\times۱۰^{۴}$	۳۷/۰۳

به طور کلی میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت حاوی پیرن در مقایسه با میانگین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت کنترل بسیار

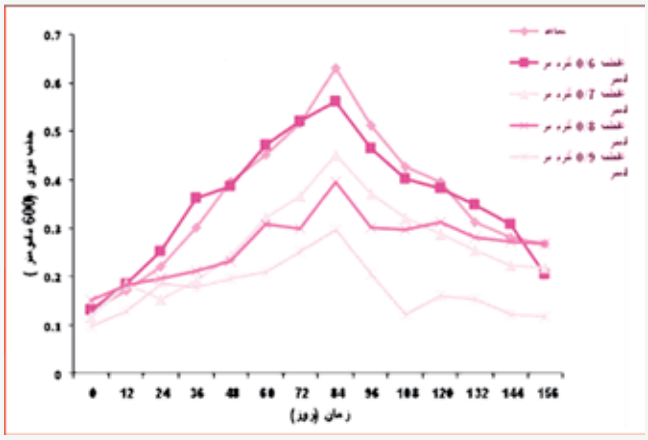
نمودار۱:درصد فراوانی باکتری های تجزیه کننده پیرن



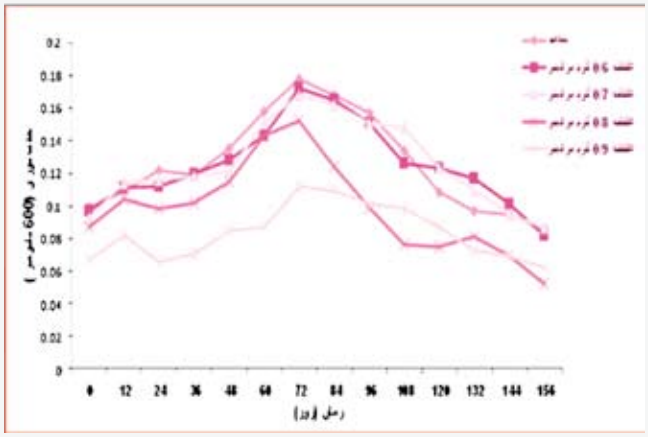
پیرن اختلاف معنی داری در سطح $p<0/05$ وجود داشت. همچنین این نتایج نشان دادند که باسیلوس، مایکو باکتریوم، سودوموناس و میکروکوکوس به ترتیب ۷۳٪، ۵۴٪، ۳۷٪، ۶٪ فراوانی باکتریایی را در خاک به خود اختصاص دادند (نمودار شماره ۱).

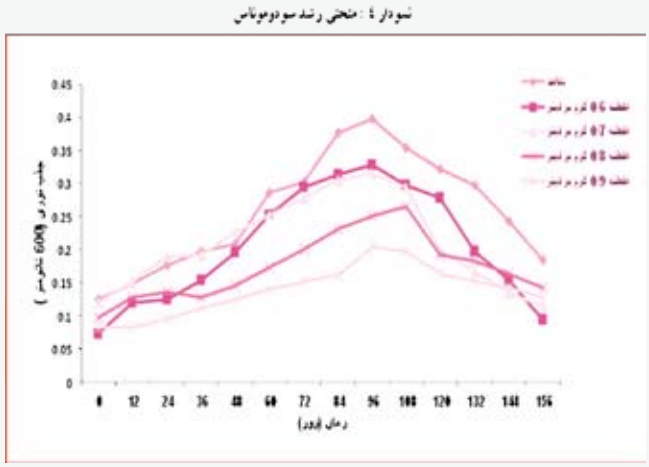
سنتیک رشد: نتایج بررسی نمودار رشد باکتری‌های جدا شده طی ۷ روز نشان داد که هر ۴ باکتری جدا شده بهترین رشد را در حضور غلظت ۰/۶ g/l پیرن داشتند در حالی که در حضور غلظت‌های بالاتر این ماده رشد باکتری‌ها کاهش پیدا می‌کند. به عبارتی باکتری‌های جدا شده با این روش توانایی تحمل غلظت‌های بالاتر از میزان لازم برای جداسازی را نداشتند. مایکوباکتریوم بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ nm با ارزش ۰/۶۳۱ بعد از ۸۴ ساعت (نمودار ۲) و سپس سودوموناس با دانسیته نوری ۰/۳۹۸ بعد از ۹۶ ساعت از شروع کشت (نمودار ۴) بالاترین رشد را نشان داد. در رتبه سوم باسیلوس با دانسیته نوری ۰/۲۴۵ پس از ۸۴ ساعت (نمودار ۵) و در نهایت میکروکوکوس (نمودار ۳) با دانسیته نوری ۰/۱۷۸ پس از ۹۶ ساعت کم‌ترین OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر را به خود اختصاص داد. با استفاده از نتایج به دست آمده از بررسی سنتیک رشد، مایکوباکتریوم به عنوان قوی‌ترین سویه جدا شده شناخته شد.

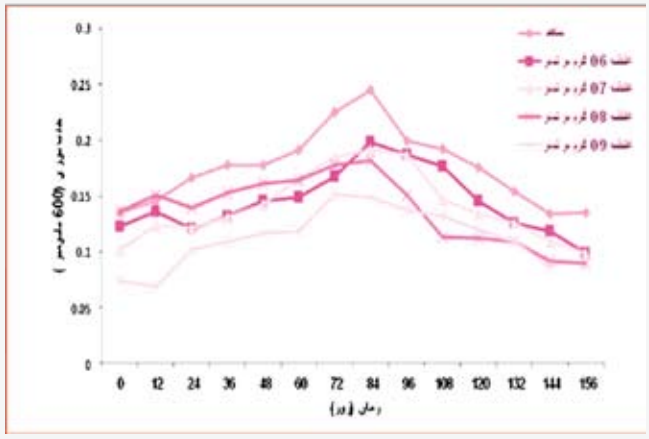
نمودار ۲ : منحنی رشد مایکوباکتریوم



نمودار ۳ : منحنی رشد میکروکوکوس







بحث

بسیاری از باکتری‌های با قابلیت تجزیه کنندگی بالا به طور گسترده‌ای در اکوسیستم آبی و خاکی پراکنده شده‌اند که به دلیل کفایت لازم جهت حذف آلاینده‌های آلی می‌توانند راه حل مناسبی جهت پایش محیطی باشند. در این مطالعه سویه‌های سودوموناس، میکروکوکوس، مایکوباکتریوم و باسیلوس در محل‌های دفن زباله در شیراز جداسازی شد. بیشترین فراوانی باکتریایی در محل‌های دفن زباله با ارزش ۷۳٪ در سویه باسیلوس مشاهده شد. در مطالعات انجام شده توسط Hunter در سال ۲۰۰۵ نیز باسیلوس سابتیلوس به عنوان سویه تجزیه کننده پیرن شناخته شد (۱۷). فراوانی این باکتری در خاک را می‌توان به وجود اسپور در این باکتری نسبت داد که از باکتری در شرایط سخت محیطی حفاظت می‌کند. همچنین در پژوهش حاضر بیشترین میزان OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر در باکتری مایکوباکتریوم مشاهده شد در نتیجه این باکتری به عنوان سویه شاخص تجزیه کننده در محل دفن زباله معرفی شد. توانایی این باکتری‌ها برای از بین بردن این ترکیبات را می‌توان به وجود پلاسمیدها در این باکتری ارتباط داد. به عبارتی می‌توان گفت که تجزیه گرهای پیرن بر روی پلاسمیدها قرار گرفته‌اند (۱۸). در پژوهش‌های گذشته که توسط هایتکمپ و همکاران با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پیرن بر روی رسوبات انجام شد، سویه مایکوباکتریوم جداسازی و بر اساس تست‌های تشخیص هویت شناسایی شد. علاوه بر این افزایش کدورت محیط در ۵۰۰ nm مورد بررسی قرار گرفت (۷). در مطالعه حاضر این باکتری کند رشد در محیط خاکی جدا شد که حاکی از رشد این باکتری توانمند در طیف گسترده‌ای در اکوسیستم خاکی و رسوبات می‌باشد. همچنین ارزش OD بدست آمده نیز توانایی بالای این باکتری در برخورد با هیدروکربن پیرن را تأیید کرد.

در مطالعات مشابهی که در سال ۲۰۱۱ توسط کریستوفر و همکاران انجام شد نیز توانایی استفاده و رشد سویه مایکوباکتریوم در محیط‌های کشت غنی سازی شده در حضور هیدروکربن پیرن تأیید گردید. باکتری جداسازی شده در تجزیه پیرن با چهار حلقه آروماتیک و فنانترن با سه حلقه آروماتیک بسیار مؤثر ولی در استفاده از بنزوپیرن با پنج حلقه آروماتیک و فلورن با سه حلقه آروماتیک ضعیف عمل کرد (۱). این محقق برای شناسایی این باکتری روش آنالیز 16srRNA را به کار برد که نتایج حاصل از تست‌های تشخیصی در این پژوهش تأیید گردید. با توجه به بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر می‌توان گفت که استفاده از روش‌های غنی سازی موجب جداسازی بهتر این باکتری مقاوم شد. نتایج این پژوهش قابل قیاس با مطالعات مشابه می‌باشد.

در مطالعات دیگری که توسط بیشنوی بر روی تجزیه پیرن انجام شد سویه‌های سودوموناس پوتیدا و سودوموناس پاسیموبیلیس برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند (۱۹). این باکتری در پژوهش حاضر نیز به عنوان سویه تجزیه کننده پیرن جداسازی شد.

مطالعات دیگری در این زمینه توسط مورزیک در سال ۲۰۰۳ بر روی تجزیه زیستی PAHs انجام و دو جنس باکتریایی به نام مایکوباکتریوم و سودوموناس که قابلیت بالایی در تجزیه اغلب ترکیبات هیدروکربن آروماتیک داشتند بررسی شد (۲۰). با وجود آن که در بررسی حاضر از محیط‌های غنی سازی شده استفاده شد با این حال نتایج حاصل از هر دو پژوهش، تأییدی بر دیگری بود. دو سویه مایکوباکتریوم و سودوموناس در پژوهش حاضر نیز به عنوان سویه‌های توانمند در تجزیه هیدروکربن پیرن جدا سازی گردید.

در پژوهش دیگر در سال ۲۰۰۶، نامچی و همکارانش توانستند سویه‌های باکتریایی تجزیه کننده هیدروکربن نفتالین بادو حلقه آروماتیک را جداسازی کنند. از میان باکتری‌های جداشده سودوموناس، بور خولدریا بهترین رشد را در OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر از خود نشان دادند. نتایج نشان داده شده در این پژوهش ارتباط مستقیم بین میزان رشد و غلظت هیدروکربن مورد بررسی را اثبات کرد (۲۱). در حالی که در نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر رشد پایین باکتریایی در غلظت‌های بالای ترکیبات آروماتیکی مشاهده گردید. این تناقض شاید حاکی از این واقعیت باشد که افزایش غلظت تا حدودی میزان رشد را افزایش می‌دهد اما غلظت‌های بسیار بالای ترکیبات آروماتیکی منجر به کاهش میزان رشد می‌شود. علاوه براین در مطالعه حاضر نیز سودوموناس جداسازی شد. در نتیجه این باکتری توانایی استفاده از طیف وسیعی از ترکیبات PAHs را دارد و همچنین از دانسیته نوری خوبی برخوردار است. بنابراین شناسایی باکتری‌ها به بهبود بخشیدن جمعیت میکروبی مناطق آلوده به هیدروکربن‌ها و امکان پاک‌سازی زیستی توسط این باکتری‌ها کمک می‌کند.

نتیجه‌گیری

در اکثر پژوهش‌های انجام شده دو جنس باکتریایی سودوموناس و مایکوباکتریوم جداسازی شده است که این واقعیت می‌تواند حاکی از مقاومت بالای این دو باکتری در برخورد با اکثر ترکیبات PAH باشد. از آن جایی که بر روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی در این منطقه کاری انجام نشده است لذا تحقیق حاضر جدید می‌باشد و امید است نتایج حاصل از این پژوهش در تعیین اولویت‌های بهداشتی توسط مسئولین محیط زیست به کار برده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Christopher W.M. L, Richard H.B, Sharyn E.G, Albert L.J. Isolation and identification pyrene mineralization Mycobacterium spp. from contaminated and uncontaminated sources. Applied and Environmental soil science. 2011;2011:1-11
2. Gokhan C, Serap K. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. Annals of Microbiology. 2005;55(4):255-259.
3. Hassan E A, Elsayed E H, Azhar AH, Amany G A, Amr A E. Isolation and identification of three-Rings polyaromatic hydrocarbons (Anthracene and phenanthrene) degrading bacteria. American-Eurasian. JAgric & Environ Sci. 2009;5(1):31-38.
4. Abou-Arab A A K, Abou-0Bakr S, Maher R A, El-Hendawy H H, Awad A A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons as affected by some lactic acid bacteria. Journal of American Science. 2010;6(11):708-715.
5. Heitkamp M A, Franklin J P, Miller D W, Cerniglia C E. Pyrene degradation by a Mycobacterium sp.: Identification of ring oxidation and ring fission products . Applied and Environmental Microbiology. 1988;54(10):2556-2565.
6. Zeyaullah M, Atif M, Islam B, Abdelkafe A S, Sultan P, Elsaady M A, Ali A. Bioremediation: A tool for environmental cleaning. African Journal of Microbiology Research. 2009;3(6):310-314.
7. Heitkamp M A, Franklin W, CFerniglia C E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene- degrading bacterium. Applied and Envionment Microbiology. 1988;54(10):2549-2555.
8. Churchill S A, Harper J P, Churchill P F. Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three-and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. 1999;65(2):549-552.
9. Hu Y , Ren F, Zzhou P, Xia M, Liu S. Degradation of pyrene and characterization of Saccharothrix sp. PYX-6 from the oligotrophic Tianchi Lake in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. Chinese Science Bulletin. 2003;48(20):2210-2215.
10. Chikoma K, Michael D A. Products from the incomplete metabolism of pyrene by poly cyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(5):1917-1922.
11. Akhavan Sepahi A, Dejban Golpasha I, Nakhoda A M. Utilization and biodesulfurization crude oil by Bacillus spp. Journal of Microbial World . 2009;1(1):5-13. [Article in Persian]
12. Sho M, Hamel C, Greer CW. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in Mycobacterium sp. strain S65. FEMS Microbial Ecol. 2004;48:209-220.
13. Chauhan C, Fazlurrahman , Oakeshott J G, Jain R K. Bacterial metabolism of Polycyclic aromatic hydrocarbon: strategies for bioremediation. Indian journal of Microbiology. 2008;48(1):95-113.
14. Kafilzadeh F, Mirzaei N, Kargar M. Isolation and identification of mercury resistant bacteria from water and sediments of Kor River, Iran. Journal of Microbial World. 2009;1(1):43-49. [Article in Persian]
15. Li X, Li P, Lin X, Zhang C, Li Q, Gong Z. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. Journal of Hazardous Materials. 2007;4(40):1-6.
16. Shafiee P, Shojaosadati S, Charkhabi . Biodegradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Aerobic Mixed Bacterial Culture Isolated from Hydrocarbon Polluted Soils. Iran J Chem Eng. 2006;25(3):73-78.
17. Hunter R D, INEkunwe S, Dodor D E, Hwang H, Lynette E. Bacillus subtilis is a Potential Degrader of Pyrene and Benzo(a) pyrene. Int J Environ Res Public Health. 2005;2(2):267-271.
18. Oluwafemi S O, Lateef B S. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: Role of plasmid. Academic Journals. 2010;5(25):4093-4106.
19. Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, Dewachter R, Verachtert H, et al. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl Environ Microbial. 2000;66:1834-1843.
20. Mrozik A, Piotrowska-Seget Z, Labuzek S. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Polish Journal of Environmental Studies. 2003;12(1):15-25.
21. Nnamchi C I, Obeta J A N, Ezeogu L I. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int J Environ Sci Tech. 2006;3(2):181-190.

Original Article

Isolation and Identification of Pyrene-Degrading Bacteria from Soils around Landfills in Shiraz and Their Growth Kinetic Assay

Kafilzadeh F[1*], Hoshyari pour F[1], Afrough R[1], Jamali H[1], Allahverdi Gh[2]

1- Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Fars, Iran.
2- Department of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

Abstract

Background & Objective: Pyrene is a kind of carcinogen hydrocarbon in environment and one of the top 129 pollutants as ranked by the U.S.Environmental Pretection Agency (USEPA). Today's commodious method that is considered by many researchers is the use of microorganisms to degrade these compounds from the environment. The goal of this research is separation and identification of the indigenous bacterias which are effective in decomposition of Pyrene hydrocarbon from soils around Shiraz Landfills. Isolated bacteria growth in the presence of different concentrations of the aforesaid organic pollutant was evaluated.

Materials & Methods: Taking samples from Landfills were done after transportation them to the laboratory. The numbers of the bacterias were counted in a medium including Pyrene 0.6 g/l and in another medium without Pyrene. The isolated bacterias were separated by the enriched medium of hydrocarbon Pyrene and were recognized accordance with standards methods (specialty of colony, microscopic properties, fermentation of sugars and biochemical test).The kinetic growth of the separated bacterias was evaluated every 12 hours during 7 successive days.

Results: It was reported that the numbers of the bacterias in the medium without Pyrene is more than those with Pyrene (cfu/g). The separated bacterias were included Bacillus spp., Pseudomonas spp., Micrococcus spp., Mycobacterium spp. These four isolated bacterias showed the best growth with Pyrene 0.6 g/l during third and fourth days.

Conclusion: The separating bacterias, effecting in decomposition of PAH, make this possibility that the modern methods with more efficiency to be created for removing the carcinogen organic polluters from the environment. Moreover, the separated bacterias (relating to this research) can be applied to develop the microbial population in the areas that polluted with Pyrene.

Keywords: Biodegradation, Pyrene, Mycobacterium, Bacillus, Carcinogen, Landfills

*** Corresponding author: Kafilzadeh Farshid,** Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Tel: +987914447001
E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir