

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۱۶-۱۰۵  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

## تجزیه زیستی آنتراسن توسط *Bacillus sp.* موجود در پساب آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای

مربعم حبیبی: دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی- مولکولی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، habibmaryam3@gmail.com  
محمد جواد مهدی پور مقدم\*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، mj\_mehdipour@guilan.ac.ir  
محمد علی زنجانیچی: استادیار شیمی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، zanjanchi@guilan.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها هستند که منشأ اصلی آن‌ها تولید صنعتی، حمل و نقل، سوزاندن زباله، تبدیل به گاز و سوزاندن پسماند پلاستیک است و از این رو باید تجزیه و یا حذف شوند. یکی از ایمن‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها، استفاده از فرآیندهای زیستی نظیر زیست‌پالایی است. در این روش از میکروارگانیسم‌ها جهت حذف یا کاهش سمیت آلاینده‌ها استفاده می‌شود. در این مطالعه زیست‌پالایی آنتراسن که یکی از PAHهای سه حلقه‌ای است، به عنوان یک ترکیب اندیکاتور جهت نشان دادن آلودگی PAH، توسط باکتری بومی جدا شده از پساب محل تجمع تانکرهای نفتی بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** جهت جداسازی و شناسایی باکتری، به ترتیب از محیط کشت پایه معدنی حاوی آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و آزمون‌های افتراقی بیوشیمیایی و آنالیز ژن *16S rDNA* استفاده شد. در آنالیز پساب، مقدار کلی هیدروکربن‌های نفتی، مقادیر هیدروکربن‌های آروماتیک و مقدار اکسیژن زیستی مورد نیاز اندازه‌گیری شد. به منظور تجزیه آنتراسن، از غلظت‌های مختلف آنتراسن و جهت تعیین میزان تجزیه آنتراسن و متابولیت‌های حاصل از تجزیه آن، به ترتیب از دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی و گاز کروماتوگرافی- طیف‌سنجی جرمی استفاده شد.

**نتایج:** این مطالعه اولین گزارش از رشد، تحمل آلاینده‌های PAH با غلظت بالا در پساب و همچنین تجزیه آنتراسن توسط *Bacillus sp. Caspian1394* است که می‌تواند غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن را با راندمان ۹۹/۵ درصد و غلظت ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر را با راندمان ۳/۴ درصد تجزیه کند. برخی از متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن، ۱ و ۴ متانوآزولن، ۲ و ۵ سیکلو هگزادین، ایکوزان، هگزادکان، هپتادکان و اکتادکان بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به رشد این باکتری در پساب با آلودگی هیدروکربنی بالا، تحمل غلظت زیاد PAHهای مختلف، اسپوردار بودن، مقاومت آن نسبت به شرایط‌های نامساعد محیطی و همچنین پراکنش در محیط‌های مختلف، این باکتری می‌تواند به عنوان یک کاندید در زیست‌پالایی محیط‌های آلوده به آنتراسن مطرح باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتراسن، پساب، کروماتوگرافی گازی، هیدروکربن‌های پلی‌آروماتیک.

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

جهش‌زایی و سرطان‌زایی، موجب نگرانی بزرگ محیط زیست شده‌اند. یکی از راهکارهای ارزان، مؤثر و ایمن جهت مقابله با این ترکیبات، زیست‌پالایی<sup>۱</sup> یا همان استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به‌منظور تجزیه، شکستن، تغییر شکل و یا اساساً حذف آلاینده‌ها از محیط است. در این فرآیند، ارگانیسم آلاینده‌شیمیایی را به‌عنوان منبع انرژی و کربن استفاده و آن را به محصولات با سمیت کمتر تبدیل می‌کند (۸). هدف از این پژوهش<sup>۲</sup> جداسازی، شناسایی و بررسی میزان تجزیه آنتراسن توسط باکتری بومی جداشده از پساب آلوده به آلاینده‌های نفتی از محل تجمع تانکرهای نفتی در شهرستان رشت است.

## مواد و روش‌ها

**نمونه پساب و آنالیز آن:** نمونه مورد آزمایش، پساب آلوده به هیدروکربن‌های نفتی بود که از یک حوضچه واقع در جایگاه تجمع تانکرهای نفتی جمع‌آوری شد (واقع در رشت با مختصات رشت - سنگر (N37.2668 E49.61171)). علت انتخاب این ناحیه، آلوده‌بودن طولانی مدت پساب با مواد نفتی است که دستیابی و جداسازی باکتری‌های بومی مقاوم و تجزیه‌کننده این هیدروکربن‌ها را امکان‌پذیر می‌کند. نمونه پساب از عمق ۳۰-۲۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. جهت نمونه‌برداری، از ظروف پلاستیکی و سرنگ استریل استفاده شد که بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و مقداری از آن نیز جهت اندازه‌گیری مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی<sup>۵</sup> توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی<sup>۶</sup> (Agilent 7890A, USA)، شناسایی هیدروکربن‌های آروماتیک پساب توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی<sup>۷</sup> (Agilent 5975C, USA) و همچنین

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای<sup>۱</sup> (PAHs) گروه بزرگی از ترکیبات آلی با دو یا چند حلقه آروماتیک (حلقه بنزن) هستند که در آرایش خط، زاویه‌ای یا خوشه‌ای قرار گرفته‌اند (۱). هیدروکربن‌های پلی آروماتیک از مهم‌ترین آلاینده‌های آب، هوا و رسوبات شناخته شده‌اند. این ترکیبات از راه‌های مختلفی وارد محیط زیست می‌شوند و از طریق فعالیت‌های طبیعی و انسانی در محیط انباشته می‌شوند و عمدتاً از احتراق ناقص مواد آلی، سوخت‌های فسیلی، نشت محصولات نفتی و فعالیت‌های مختلف صنعتی و بخشی از آن در اثر فعالیت‌های طبیعی مانند آتش‌سوزی جنگل‌ها و فوران‌های آتش‌فشانی تولید می‌شوند. براساس سمیت آن‌ها، سازمان حفاظت از محیط زیست ایالت متحده<sup>۲</sup>، 16 PAH را به‌عنوان آلاینده در اولویت پالایش مطرح کرده است (۲-۴). پایداری PAH‌ها در محیط زیست، به عوامل مختلفی نظیر ساختار شیمیایی، غلظت، پراکندگی و دسترسی زیستی آلاینده بستگی دارد. علاوه بر این، عوامل محیطی مانند نوع و ساختار خاک، اسیدیته<sup>۳</sup>، دما، سطوح کافی اکسیژن، مواد مغذی و آب جهت فعالیت میکروکروبی تجزیه‌کننده آلاینده، زمان پایداری PAH در طبیعت را کنترل می‌کند. به‌طور کلی، هرچه وزن ملکولی ملکول PAH بیشتر باشد، آبگریزی و سمیت و پایداری زیست‌محیطی آن ملکول بیشتر می‌شود (۵ و ۶). از جمله PAH، آنتراسن است که یک هیدروکربن آروماتیک سه‌حلقه‌ای مشتق از قطران ذغال‌سنگ با فرمول شیمیایی  $H_{10}C_{14}$  است (۷). آنتراسن از جمله سوبستراهای مدل یا شناساگر در مطالعات تجزیه محیطی PAH‌ها است. هیدروکربن‌های پلی آروماتیک موجود در طبیعت به‌علت سمیت،

رنگ آمیزی گرم و کپسول، آزمون های افتراقی بیوشیمیایی و همچنین آنالیز مولکولی استفاده شد. در آنالیز مولکولی، از واکنش زنجیره ای پلیمراز<sup>۹</sup> ژن *16S rDNA* و سپس توالی یابی آن برای شناسایی استفاده شد. در این آنالیز، استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام گرفت. در این روش، سوسپانسیونی از نمونه باکتری تهیه شد و به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جوشانده شد. سپس PCR (با استفاده از پرایمرهای عمومی<sup>۱۰</sup> 27F<sup>۱۰</sup> و 1492R (جدول ۱) انجام شد (جدول ۲ و ۳) (۱۰). بعد از مشاهده باندها ۱۵۰۰ bp، این باندها از ژل استخراج شد تا توالی یابی شود (روش سنگر) (شرکت SeqLab، آلمان). توالی به دست آمده با توالی ژن های *16S rDNA* موجود در پایگاه اطلاعاتی داده های ncbi تطبیق<sup>۱۱</sup> تا مشخص شود به کدام باکتری تعلق دارد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای عمومی 27F و 1492R.

ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر (3→5)
۱	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
۲	1492R	GGTTACCTGTACGACTT

جدول ۲- مواد مصرفی در واکنش PCR

ماده مصرفی	غلظت	مقدار (ماکرو لیتر)
DNA الگو	۳۰ میلی گرم	۲
پرایمر رفت	۰/۵ میلی مولار	۱
پرایمر برگشت	۰/۵ میلی مولار	۱
Master mix	-	۱۰
آب مقطر	-	۶

اندازه گیری مقدار اکسیژن زیستی مورد نیاز<sup>۸</sup> به آزمایشگاه ارسال شد. BOD خیلی بالا نشان دهنده بار آلی زیاد و همچنین حضور میکروارگانیسم های هوازی زیاد در پساب است.

#### جداسازی باکتری تجزیه کننده آنتراسن: جهت

جداسازی باکتری تجزیه کننده آنتراسن، از محیط کشت پایه معدنی که در آن آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بود استفاده شد. بدین منظور به یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت پایه معدنی (بر حسب گرم بر لیتر) شامل ۲/۸۴ گرم  $(NH_4)_2SO_4$ ، ۲/۳۸ گرم  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ، ۵/۶۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  و ۱ میلی لیتر عناصر کمیاب (در لیتر) شامل ۰/۶۴ گرم  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۰/۱۱ گرم  $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۰/۷۹ گرم  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ، ۰/۱۵ گرم  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  و همچنین ۰/۰۱ گرم آنتراسن و ۱ میلی لیتر نمونه پساب (اسیدیته محیط کشت برابر ۷/۲) اضافه شد (۹). ارلن حاوی نمونه همراه با شاهد (محیط کشت تنها) در انکوباتور شیکردار با ۱۳۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته قرار داده شد. با مشاهده کدورت در محیط کشت مایع و به منظور حصول اطمینان از وجود باکتری، مقدار ۱ میلی لیتر از محتویات محیط کشت موجود در ارلن به محیط پایه معدنی جامد تلقیح شد.

به منظور دستیابی به باکتری های خالص تجزیه کننده آنتراسن، ارلن حاوی نمونه اصلی، ۵ بار به صورت متوالی با فاصله زمانی یک هفته به محیط پایه معدنی مایع انتقال داده شد و پس از هر بار انتقال، رشد باکتری ها از طریق کشت در محیط کشت پایه معدنی جامد بررسی شد.

#### شناسایی باکتری تجزیه کننده آنتراسن: بعد از رشد و

تهیه کلنی خالص، جهت شناسایی جدایه مورد نظر از

جدول ۳- چرخه حرارتی PCR ژن *16S rDNA*.

مراحل	دما (°C)	زمان (دقیقه)
واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۴
واسرشت‌سازی	۹۴	۱
اتصال آغازگر به رشته	۵۵	۱
بسط پلیمریز	۷۲	۱
بسط نهایی	۷۲	۱۰

شد. بعد از گذشت ۲۰ روز و مشاهده کدورت که نشان‌دهنده رشد باکتری در غلظت‌های مربوطه است، آنتراسن باقی‌مانده در محیط کشت با استفاده از روش مایع-مایع استخراج شد. برای استخراج، از دکانتور ۲۵۰ میلی‌لیتری استفاده شد. پنجاه میلی‌لیتر محیط کشت به دکانتور منتقل و ۲۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به‌عنوان حلال به‌مرور و طی چند مرحله به آن اضافه شد. سپس محلول به‌خوبی تکان داده شد تا حلال به‌خوبی با محیط همگن شود و بعد از چند دقیقه، دو فاز آبی و آلی به‌راحتی از یکدیگر جدا شدند. سپس ناحیه شفاف که حاوی فاز آلی و سوبستراست، به داخل یک بشر تخلیه و نمونه استخراج می‌شود. جهت آنالیز از روش PY-ANT.M و از دستگاه GC (Agilent 7890A, USA) استفاده شد (۱۰). به‌منظور شناسایی متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن توسط باکتری، فاز آلی موجود در محیط کشت که شامل آنتراسن و متابولیت‌های آن است توسط روش مایع-مایع استخراج و جهت آنالیز از روش PAH-M و دستگاه GC-MS (Agilent 5975C, USA) استفاده شد (۱۰).

### نتایج

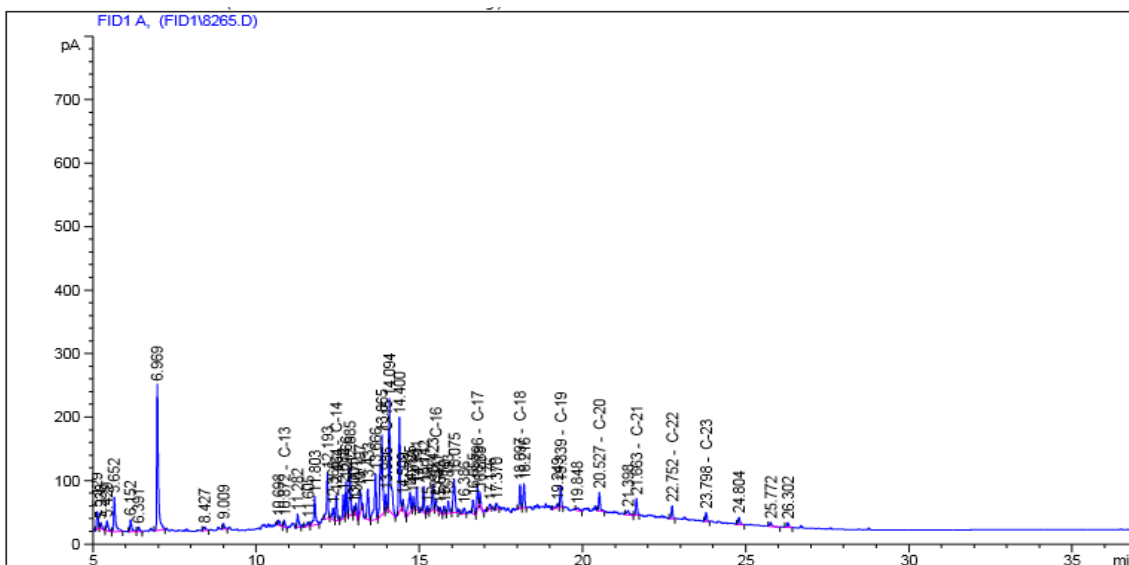
**آنالیز پساب:** مقدار TPH (شکل ۱) و همچنین BOD نمونه پساب بالا و به‌ترتیب ۱۶/۷۳ و ۳۷۴۳ میلی‌گرم بر لیتر بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری هیدروکربن‌های آروماتیک موجود در پساب نیز در شکل ۲ و جدول ۴ آورده شده است.

### بررسی میزان رشد جدایه در محیط حاوی آنتراسن:

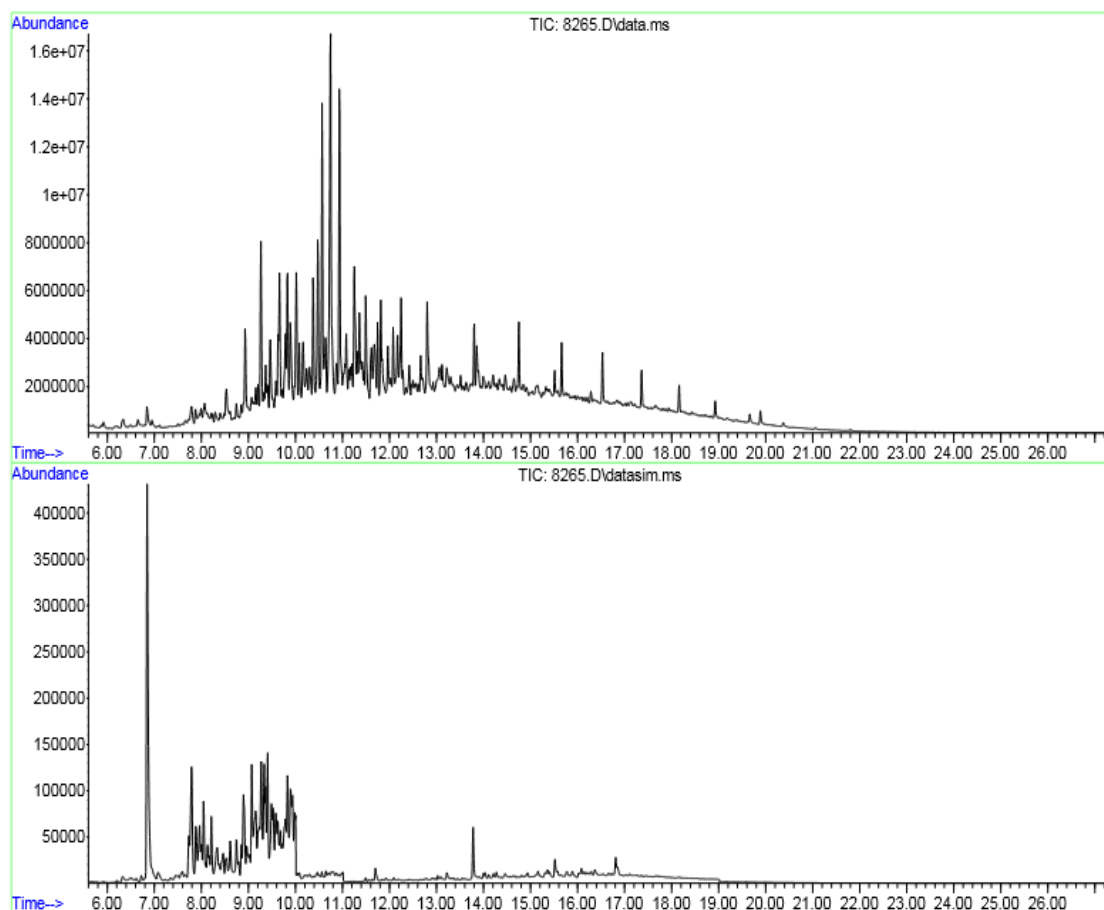
جهت بررسی میزان رشد باکتریایی در محیط کشت پایه معدنی مایع، از دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. در این قسمت از آزمایش از ۵ شاهد استفاده شد که عبارت‌اند از: محیط کشت تنها (شاهد ۱)، محیط کشت + ۱ میلی‌لیتر پساب غیراستریل (شاهد ۲)، محیط کشت + ۱ میلی‌لیتر پساب استریل (با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرون) (شاهد ۳)، محیط کشت + آنتراسن (۰/۱ گرم آنتراسن را در ۱ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل شد) (شاهد ۴) و محیط کشت + پساب استریل + آنتراسن (شاهد ۵). جذب نوری محتویات ۵ ارلن شامل نمونه اصلی و ۴ شاهد (به‌جز شاهد ۱)، به فاصله زمانی ۴ روز به‌طور متوالی اندازه‌گیری شد. تغییرات اسیدیته نیز در طی تجزیه آنتراسن توسط باکتری، با استفاده از اسیدیته متر بررسی شد.

### بررسی میزان تجزیه آنتراسن و شناسایی

متابولیت‌های حاصل از تجزیه آن: به‌منظور تعیین غلظت قابل تحمل آنتراسن و حداکثر غلظتی که توسط باکتری تجزیه می‌شود، سری رقتی از آنتراسن (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط پایه معدنی تهیه



شکل ۱- کروماتوگرام TPH پساب



شکل ۲- کروماتوگرام GC-MS پساب

نشان داد که سویه ذکر شده با ۱۴۰۶ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰ درصد با توالی *16s rDNA* بسیاری از سویه‌های *Bacillus cereus*، *anthracis Bacillus* و *thuringiensis Bacillus* مشابهت دارد. توالی *16s rDNA* این باکتری در بانک ژنی<sup>۱۲</sup> مربوط به NCBI با شماره دستیابی<sup>۱۳</sup> KX216517 و به نام *Bacillus sp. Caspian1394* ثبت شد.

**میزان رشد جدایه در محیط حاوی آنتراسن:**  
همان‌طور که انتظار می‌رفت با گذشت زمان، میزان رشد باکتری با افزایش جذب نوری تأیید شد و جذب نوری نمونه‌های شاهد اندکی دچار تغییرات شد که احتمالاً می‌تواند ناشی از خطای انسانی و دستگاهی باشد. کمترین میزان جذب نمونه اصلی مربوط به روز چهارم و مقدارش ۰/۲۰ و بیشترین آن مربوط به روز بیست و هشتم و مقدارش ۰/۸۵ بود. به عبارتی با گذشت زمان میزان رشد و تجزیه آنتراسن بیشتر می‌شود (شکل ۳).

از لحاظ تغییرات اسیدیته نیز، در روز اول اسیدیته برابر ۷/۲ و در روز بیستم به ۶/۵ رسید. در نتیجه به نظر می‌رسد کاهش اسیدیته به دلیل تولید ترکیبات اسیدی ناشی از تجزیه آنتراسن باشد.

**بررسی میزان تجزیه آنتراسن و شناسایی متابولیت‌های حاصل از تجزیه آن:** در ابتدا جهت تجزیه آنتراسن توسط جدایه مورد نظر، از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن استفاده شد و پس از تلقیح باکتری و با گذشت زمان ۲۰ روز، با استفاده از دی کلرومتان میزان آنتراسن باقی‌مانده استخراج و توسط دستگاه GC اندازه‌گیری شد. نتیجه آنالیز نشان داد میزان آنتراسن از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافته است، به عبارتی راندمان تجزیه ۹۹/۵ درصد است (شکل ۴).

جدول ۴- هیدروکربن‌های آروماتیک موجود در پساب

نمونه (پساب)	ماکروگرم بر میلی‌لیتر
Naphthalene	۱۴
Acenaphthalene	<۰/۷
Acenaphthylen	<۰/۷
Fluorene	<۰/۷
Phenanthrene	<۰/۷
Anthracene	<۰/۷
Fluoranthene	<۰/۷
pyrene	<۰/۷
Chrysene	<۰/۷
Benzo{a} anthracene	<۰/۷
Benzo{b} fluoranthene	<۰/۷
Benzo{k} fluoranthene	<۰/۷
Dibenzo{ah} anthracene	<۰/۷
Indeno{123-cd} pyrene	<۰/۷
Benzo{ghi} perylene	<۰/۷

جدول ۵- نتایج آزمون افتراقی بیوشیمیایی

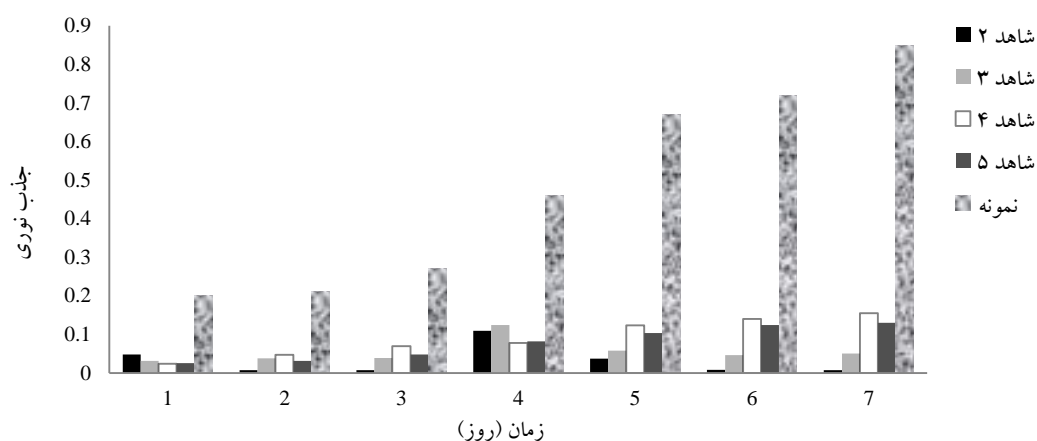
آزمون‌ها	نتیجه
تخمیر گلوکز	+
تخمیر لاکتوز	-
تخمیر گالاکتوز	-
مالونات	+
سیترات	-
MR	+
VP	-
H <sub>2</sub> S	-
CO <sub>2</sub>	-
حرکت	-

#### جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده آنتراسن:

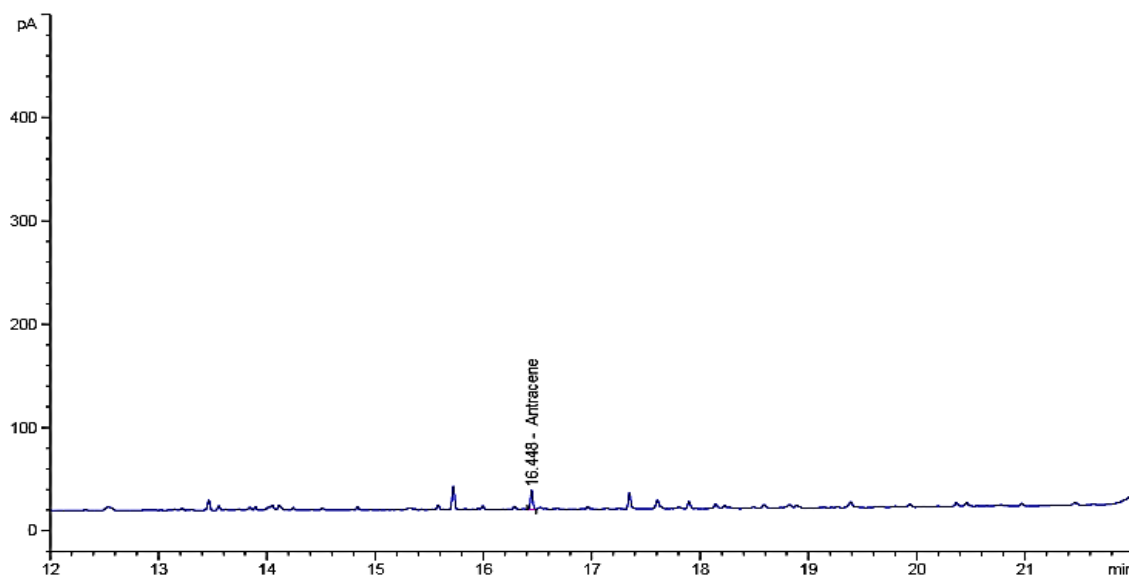
نتیجه آزمون گرم نشان داد که این جدایه، باسیل گرم مثبت فاقد کپسول با کلنی‌های نسبتاً بزرگ نامنظم و غیرمسطح است. نتایج آزمون افتراقی بیوشیمیایی نیز در جدول ۵ آورده شده است. توالی‌یابی محصول PCR

توسط آن کاهش می‌یابد (شکل ۵). در ارتباط با شناسایی متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن که با استفاده از دستگاه GC-MS انجام گرفت، بیشترین متابولیت‌های حاصل از تجزیه، شامل ۱ و ۴ متانوآزولن، ۲ و ۵ سیکلو هگزادین، ایکوزان، هگزادکان، هپتادکان و اکتادکان بودند (شکل ۶).

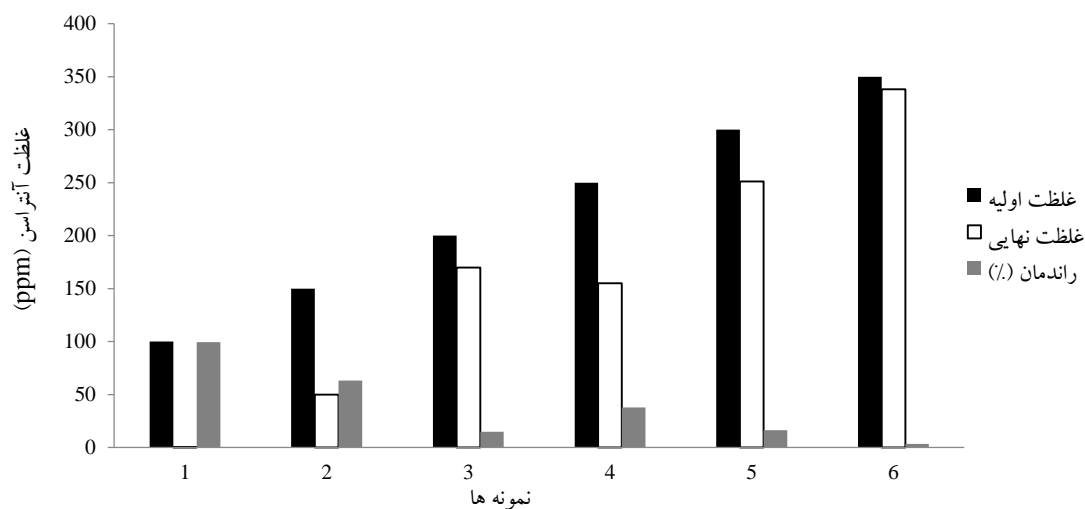
نتایج حاصل از آنالیز GC نشان داد بیشترین و کمترین میزان تجزیه آنتراسن توسط جدایه به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر و ۳۵۰ میلی گرم بر لیتر با راندمان‌های تجزیه ۶۳/۳ درصد و ۳/۶ درصد است؛ بنابراین با افزایش غلظت آنتراسن، میزان رشد باکتری و در نتیجه میزان تجزیه آنتراسن



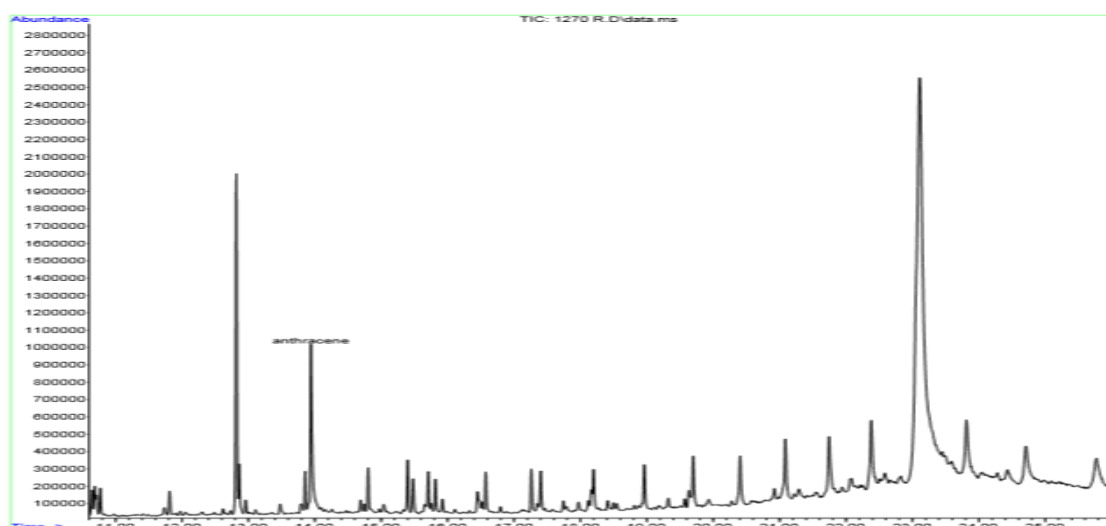
شکل ۳- تغییرات جذب نوری محیط حاوی آنتراسن در نمونه‌های اصلی و شاهد در طول موج ۶۰۰ نانومتر.



شکل ۴- کروماتوگرام GC نشان‌دهنده آنتراسن.



شکل ۵- میزان تجزیه آنتراسن در غلظت‌های مختلف. نمونه‌ها، ارلن‌های حاوی غلظت‌های مختلف آنتراسن را نشان می‌دهند.



شکل ۶- کروماتوگرام GC-MS مربوط به متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن.

## بحث و نتیجه‌گیری

وجود آلاینده‌ها به‌ویژه PAHها در محیط یک مشکل زیست‌محیطی مهمی به‌شمار می‌رود. آنتراسن از جمله هیدروکربن‌های سه‌حلقه‌ای است که در غلظت‌های بالا در رسوبات آلوده به PAH، خاک‌های سطحی و مکان‌های دارای پسماند  $^{14}$  یافت می‌شود و به‌عنوان یک شناساگر جهت شناسایی آلودگی محیط به

PAH به کار می‌رود. برخلاف PAH با وزن مولکولی بالا (دارای چهار حلقه و بیشتر)، آنتراسن خطری برای سلامتی انسان و اثر سمی برای ژنوم  $^{15}$  و همچنین خاصیت سرطان‌زایی ندارد اما برای ماهی‌ها و جلبک‌ها سمی است (۱۱). سرنوشت PAHها در محیط شامل تبخیر، فتواکسیداسیون، اکسیداسیون شیمیایی، تجمع زیستی  $^{16}$  و جذب به ذرات خاک است. باوجوداین، به



هیدروکربن‌های نفتی (سورفکتانت‌ها) نیز اغلب باعث ادامه و سهولت عملیات شکستن و تجزیه، می‌شود و همچنین با تولید این محصولات از سمیت مواد اولیه کاسته می‌شود و حتی ممکن است نوع و ترکیب متابولیت‌ها از نظر کارایی شیمیایی خیلی مهم و مفید باشد (۱۴).

در مطالعه احمد<sup>۲۱</sup> و همکاران، باکتری قلیادوست *Bacillus badius* D1 جداسازی شده از دریاچه‌ای در هند توانست آنتراسن با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را در اسیدیته برابر ۹ طی مدت ۶۰ ساعت به‌طور کامل تجزیه کند. بیشترین میزان رشد این باکتری با میزان جذب نوری برابر ۲/۲۵ و بعد از مدت ۴۸ ساعت به دست آمد. در مطالعه آن‌ها، متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن شامل ۱،۲ دی هیدروکسی آنتراسن، ۳Z-۴-۳J-۳-هیدروکسی (۲-نفیل) ۲-کوبوت ۳-انوئیک اسید، ۶،۷ بنزو کومارین، ۱-متوکسی ۲-هیدروکسی آنتراسن، (E)-۳-(۲-هیدروکسی نفتالن-۳-ایل) آکرلیک اسید، فتالیک اسید، ۹، ۱۰ دی هیدروکسی آنتراسن، ۹، ۱۰-آتراکونون بودند (۱۵).

در مطالعه مودی<sup>۲۲</sup> و همکاران، *Mycobacterium sp. starin* PYR-1 بعد از مدت ۱۴ روز توانست آنتراسن با غلظت ۱۳/۳ میلی‌گرم بر لیتر را با راندمان ۹۲ درصد تجزیه کند. متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن در مطالعه آن‌ها cis-۱، ۲-دی هیدروکسی-۱، ۲-دی هیدروکسی آنتراسن، ۶، ۷-بنزو کومارین، ۱-متوکسی ۲-هیدروکسی آنتراسن و ۹، ۱۰-آتراکونون بودند (۱۲).

در مطالعه لی لی<sup>۲۳</sup> و همکاران، باکتری گرم مثبت جداسازی شده از خاک آلوده تعمیرگاه اتومبیل<sup>۲۴</sup> به نام *Brachy bacterium paracouglomeratum* توانست

نظر می‌رسد فرآیندهای اصلی برای برداشتن PAH ها از محیط، تغییر شکل<sup>۱۷</sup> و تجزیه میکروبی یا همان زیست‌پالایی باشند (۱۲). با توجه به اهمیت زیست‌پالایی آلاینده‌ها، در این پژوهش نیز هدف جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه‌کننده آنتراسن و همچنین بررسی میزان تجزیه آن توسط این باکتری بود. در این مطالعه براساس آزمون‌های افتراقی بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن *16s rDNA* یک باکتری گرم مثبت، اسپوردار و بومی به نام *Bacillus sp. Caspian1394* از پساب محل تجمع تانکرهای نفتی جداسازی و شناسایی شد که قادر به تجزیه آنتراسن بود. این جدایه قادر بود غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن را با راندمان ۹۹/۵ درصد طی مدت ۲۸ روز تجزیه کند. برخی از متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن، ۱ و ۴ متانوآزولن، ۲ و ۵ سیکلوهورگازین، ایکوزان، هگزادکان، هپتادکان و اکتادکان بودند.

به‌طور کلی گونه‌های *Bacillus* گونه‌های میکروبی مستعد هستند که به‌طور گسترده به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و عوامل فعال سطحی نظیر سورفکتین<sup>۱۸</sup>، فنژیسین<sup>۱۹</sup>، لیکنسن<sup>۲۰</sup> و غیره مطالعه شده‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که هیدرولیز بیشتر PAHs در اسیدیته بالای خنثی اتفاق می‌افتد و با توجه به دو ویژگی مهم گونه‌های *Bacillus* یعنی تولید بیوسورفکتانت و رشد در اسیدیته قلیایی سبب شده تا این باکتری‌ها به‌عنوان یک کاندید در تجزیه PAHs مدنظر قرار بگیرند (۱۳).

به‌طور کلی تجزیه آنتراسن در حضور جدایه تجزیه‌کننده آن و تحت شرایط انکوباسیون مناسب به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. علاوه بر آنزیم‌ها، متابولیت‌های تولیدشده از باکتری‌های تجزیه‌کننده

*Kurthia* sp. کاهش پیدا کرد. بیشترین میزان رشد این باکتری در هر سه غلظت ۱۰، ۱۶ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر طی مدت ۳۹ ساعت و بیشترین میزان جذب نوری در این سه غلظت به ترتیب ۰/۴۸، ۰/۳ و ۰/۲۸ بود. *M. Kurthia* sp. SBA4، *B. circulans* SBA12 و *varians* SBA8 *D. radiodurans* SBA6 به ترتیب توانستند آنتراسن با غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر را با راندمان ۸۷/۵ درصد، ۸۶/۶ درصد، ۸۶/۶ درصد و ۸۱/۸ درصد پس از مدت ۶ روز تجزیه کند (۱۸).

در مطالعه هرویجن<sup>۲۹</sup> و همکاران که تجزیه آنتراسن توسط *Mycobacterium* sp. LB501T در محدوده غلظتی ۲/۷-۰/۱ میلی گرم بر لیتر انجام گرفت، بیشترین میزان تجزیه در غلظت ۲/۴ میلی گرم بر لیتر با جذب نوری برابر ۰/۶۸ و در روز یازدهم بوده است (۱۹).

در این مطالعه برخلاف سایر مطالعه‌ها، باکتری تجزیه‌کننده آنتراسن از پساب با آلودگی PAH بالا جداسازی شد و این نشان‌دهنده آن است که این باکتری نسبت به سایر باکتری‌های مطالعه‌شده در ارتباط با تجزیه آنتراسن، تحمل و مقاومت بیشتری نسبت به بسیاری از آلاینده‌ها دارد. برخلاف مطالعه احمد و لی لی، در سایر موارد، جدایه ما نسبت به جدایه‌هایی که سایر پژوهشگران استفاده کرده‌اند، قدرت تحمل بالایی نسبت به آنتراسن داشته (۳۰۰ میلی گرم بر لیتر با راندمان ۳/۴ درصد تجزیه) ولی از طرفی میزان تجزیه آنتراسن توسط جدایه ما نسبت به سایر جدایه‌ها به زمان بیشتری نیاز داشته است. در این مورد احتمالاً *Bacillus* sp. Caspian 1394 توانسته آنتراسن را تجزیه کند ولی فرصت بیشتری به باکتری جهت تجزیه آنتراسن داده شده است. دلیل احتمالی در این زمینه می‌تواند بیان کم

غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن را با راندمان ۷۰/۳۲ درصد طی ۱۰ روز تجزیه کند و بعد از ۱۰ روز به دلیل عدم تغییر در شمارش تعداد باکتری، افزایش تجزیه حاصل نشد (۱۶).

در مطالعه امینی و همکاران، از خاک آلوده به نفت در محدوده پالایشگاه اصفهان، باکتری *Nocardia cyriacigeorgica* ATAI20 را جداسازی کردند که قادر بود آنتراسن با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر را با راندمان ۳۶/۶ درصد بعد از ۹ روز تجزیه کند (۱۷).

آرولاژگان<sup>۲۵</sup> و همکاران، کونسرسیوم باکتریایی مقاوم به شوری<sup>۲۶</sup> را از محیط دریا جداسازی کردند. بیشترین میزان رشد کونسرسیوم (شمارش) در محیط حاوی آنتراسن در روز چهارم و بیشترین میزان تجزیه در روز پنجم بوده است. این کونسرسیوم توانست غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر آنتراسن را در حضور غلظت ۳۰ گرم بر لیتر کلرید سدیم، طی مدت ۲ روز ۴۹ درصد و طی مدت ۴ روز ۹۵ درصد تجزیه کند. در غلظت ۶۰ گرم بر لیتر کلرید سدیم، کونسرسیوم توانست آنتراسن را طی مدت ۴ روز با راندمان ۳۹ درصد تجزیه نماید (۱۲).

در مطالعه بیشت<sup>۲۷</sup> و همکاران، ۱۶ باکتری تجزیه‌کننده آنتراسن از ریزوسفر گیاه سپیدار لرزان<sup>۲۸</sup> که در حال رشد در خاک غیر آلوده بودند، جداسازی شدند. در بین جدایه‌ها، چهار جدایه یعنی *Kurthia* sp. SBA8، *Micrococcus varians* SBA4، *Bacillus Deinococcus radiodurans* SBA6 و *circulans* SBA12 توانستند علاوه بر آنتراسن و نفتالن از بنزن و تولوئن نیز استفاده کنند. *Kurthia* sp. و *B. circulans* پاسخ کموتاکتیک مثبت به نفتالن و آنتراسن نشان دادند. در مطالعه آن‌ها با افزایش غلظت آنتراسن از ۱۰ به ۲۰ میلی گرم بر لیتر میزان رشد

- (4) Baek SO., Field RA., Goldstone ME., Kirk PW., Lester JN., Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, and Soil Pollution* 1991; 60(3): 279-300.
- (5) Haritash AK., Kaushid CP. Biodegradation aspects of polyaromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 2009; 169(1-3): 1-15.
- (6) Hatzinger PB., Alexander M. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* 1995; 29(2): 537-545.
- (7) McNaught AD., Wilkinson A. *IUPAC. Compendium of chemical terminology*. 2nd ed. (the "Gold Book"). Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
- (8) Alvarez PJJ., Illman WA. *Bioremediation and natural attenuation, process fundamentals and mathematical models*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken; 2006.
- (9) Ferradji FZ., Mnif S., Badis A., Rebbani S., Fodil D., Eddouaouda K., Sayadi S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil. (North of Algeria). *International Biodeterioration and Biodegradation* 2014; 86(C): 300-308.
- (10) A. Frank J., I. Reich C., Sharma S., S. Weisbaum J., A. Wilson B., J. Olsen G. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial *16S rRNA* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74(8): 2461-2470.
- (11) Balachandran C., Durairandiyam V., Balakrishna K., Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology* 2012; 112: 83-90.

ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌های دخیل در تجزیه آنتراسن و یا فعالیت کم این آنزیم‌ها باشد. همچنین در این مطالعه، متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن متفاوت از متابولیت‌های حاصل از تجزیه آنتراسن در مطالعات پژوهشگران دیگر بود ولی این قسمت نیاز به آنالیز بیشتر و دقیق‌تری دارد تا تأیید کند که مسیر تجزیه آنتراسن در این باکتری متفاوت یا مشابه مسیر تجزیه آنتراسن در سایر باکتری‌هایی که دیگر پژوهشگران مطالعه کرده‌اند، است.

با توجه به اینکه این باکتری توانست در پساب با آلودگی هیدروکربنی بالا رشد کند و غلظت بالای بسیاری از آلاینده‌های PAH را تحمل نماید و با توجه به اسپوردار بودن این باکتری و در نتیجه مقاومت نسبت به شرایط نامساعد محیطی و همچنین پراکنش آن در محیط‌های مختلف، شاید بتوان از این باکتری در زیست‌پالایی محیط‌های آلوده به آنتراسن استفاده کرد. البته در این زمینه نیاز است تا تأثیر عوامل زیستی و غیرزیستی بر روی رشد این باکتری و روند تجزیه آنتراسن و حتی سایر آلاینده‌های PAH توسط این باکتری بررسی شود.

## References

- (1) Cerniglia, CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 1992; 3 (2): 351-368.
- (2) Freeman DJ., Cattell FCR. Wood burning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 1990; 24(10): 1581-1585.
- (3) Coates JD., Anderson RT., Lovley DR. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62(3): 1099-1101.

- (12) Moody JD., Freeman JP., Doerge DR., Cerniglia CE. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67(4): 1476-1483.
- (13) Arulazhagan P., Vasudevan N., Yeom LT. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2010; 7(4): 639-652.
- (14) Ahmed TA., Othman MA., Sarwade VD., Kachru GR. Degradation of anthracene by alkaliphilic bacteria *Bacillus badius*. *Environment and Pollution* 2012; 1(2): 97-104.
- (15) Lily MK., Bahuguna A., Bhatt KK., Dangwal K. Degradation of Anthracene by a novel strain *Brachybacterium paraconglomeratum* BMIT637C (MTCC 9445). *International Journal of Environmental Sciences* 2013; 3(4): 1242-1252.
- (16) Amini I., Tahmourespour A., Abdollahi A., Douidi M. Isolation, molecular identification & anthracene biodegradation of *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil refinery soil in Isfahan. *Journal of Microbial World* 2013; 6(3): 228- 236.
- (17) Bisht S., Pandey P., Sood A., Sharma S., Bisht NS. Biodegradation of naphthalene and anthracene by chemo-tactically active rhizobacteria of *Populus deltoids*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41(4): 922-930.
- (18) Herwijnen RV., Springael D., Slot P., Govers HAJ., Parsons JR. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through *o*-phthalic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(1): 186-190.
- (19) Ismail W., Gescher J. Epoxy coenzyme a thioester pathways for degradation of aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78(15): 5043-5051.

- 
- <sup>1</sup>- PAHs
  - <sup>2</sup>- US EPA
  - <sup>3</sup>- pH
  - <sup>4</sup>- Bioremediation
  - <sup>5</sup>- Total petroleum hydrocarbon (TPH)
  - <sup>6</sup>- Gas chromatography (GC)
  - <sup>7</sup>- Gas chromatography- Mass spectrometry (GC-Mass)
  - <sup>8</sup>- Biological oxygen demand (BOD)
  - <sup>9</sup>- Polymerase chain reaction (PCR)
  - <sup>10</sup>- Universal
  - <sup>11</sup>- Alignment
  - <sup>12</sup>- GeneBank
  - <sup>13</sup>- Accession number
  - <sup>14</sup>- wastes
  - <sup>15</sup>- Genotoxic
  - <sup>16</sup>- Bioaccumulation
  - <sup>17</sup>- Transformation
  - <sup>18</sup>- Surfactin
  - <sup>19</sup>- Fengycin
  - <sup>20</sup>- lichenysin
  - <sup>21</sup>- Ahmed
  - <sup>22</sup>- Moody
  - <sup>23</sup>- Lily
  - <sup>24</sup>- Automobile workshop
  - <sup>25</sup>- Arulazhagan
  - <sup>26</sup>- Halotolerant
  - <sup>27</sup>- Bisht
  - <sup>28</sup>- *Populus deltoids*
  - <sup>29</sup>- Herwijnen

## Biodegradation of anthracene by *Bacillus* sp. in wastewater contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons

Maryam Habibi

M.Sc. student of cellular and molecular biology, University of Guilan, Rasht, Iran, habibimaryam3@gmail.com

Mohammad Javad Mehdipour Moghaddam \*

Assistant Professor of Microbiology, University of Guilan, Rasht, Iran, mj\_mehdipour@guilan.ac.ir

Mohammad Ali Zanjanchi

Professor of Chemistry, University of Guilan, Rasht, Iran, zanjanchi@guilan.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most important pollutants that majorly originate from industrial production, transportation, refuse burning, gasification and plastic waste incineration and therefore must be degraded or removed. One of the safest and cheapest methods is the utilization of biologic processes such as bioremediation. In this method, microorganisms are employed to remove or reduce the pollutants toxicity. Bioremediation of anthracene as one of the tricyclic PAHs by a local bacterium that was isolated from wastewater of oil tankers station was investigated in this study.

**Materials and methods:** Inorganic basal medium containing anthracene as the sole source of carbon and energy, biochemical tests and *16s rDNA* gene analyses were applied respectively for bacterium isolation and identification. In wastewater analysis, the parameters such as total petroleum hydrocarbons (TPHs), aromatic hydrocarbons and biological oxygen demand (BOD) were measured. For anthracene degradation, different concentrations of anthracene (100, 150, 200, 250, 300 and 350 mg/l) were used. Gas chromatography (GC) and Gas chromatography-mass spectrometry (GC-Mass) were applied to determine anthracene residue and metabolites from anthracene degradation, respectively.

**Results:** The current study showed the ability of *Bacillus* sp. Caspian1394 to grow in wastewater and tolerate PAH pollutants with high concentration and also degrade anthracene. This bacterium degraded 100 and 350 mg/l concentrations of anthracene with 99.5% and 3.4% efficiency, respectively. Some of the metabolites derived from anthracene degradation were 1,4-methanoazulene, 2,5-cyclohexadiene, hexadecane, heptadecane, ocadecane and eicosane

**Discussion and conclusion:** The studied bacterial strain can grow in wastewater with high contamination to hydrocarbons and tolerate high concentrations of different PAHs. It is a spore forming bacterium leading to its resistance to unfavorable conditions and also dispersion in different environments. Then, it can be proposed as a candidate in bioremediation of environments contaminated with anthracene.

**Key words:** Polycyclic hydrocarbons, anthracene, wastewater, gas chromatography

---

\* Corresponding author

**Received:** February 14, 2016 / **Accepted:** July 4, 2015