مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۲۳۶-۲۲۸

Original Article

جداسازی، شناسایی مولکولی و ارزیابی تجزیه زیستی آنتراسن *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* جدا شده از خاک پالایشگاه اصفهان

ایمانه امینی*[۱]، آرزو طهمورث پور[۲]، آتوسا عبداللهی[۲]، منیر دودی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان اصفهان، گروه علوم پایه، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای گروهی از ترکیبات غیر قطبی هستند که به دلیل پایداری در محیط و سمیت بالا از نگرانی‌های عمده سازمان حفاظت از محیط زیست محسوب می گردند. تجزیه زیستی این ترکیبات روشی ارزان و ایمن برای پاک‌سازی محیط می باشد. این پژوهش با هدف، جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌ای از جنس *نوکاردیا* با توانایی تجزیه آنتراسن در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی با نمونه برداری از خاک آلوده به نفت در محدوده پالایشگاه اصفهان وتعیین برخی از ویژگی‌های شیمیایی نمونه انجام گرفت. برای جداسازی باکتری ها از روش غنی سازی در محیط کشت پایه نمکی حاوی ۵۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن استفاده شد. جدایه ای که مورفولوژی شبیه به *نوکاردیا* داشت برای ادامه مطالعه انتخاب گردید. آزمون های های بیوشیمیایی و آنالیز توالی ژن 16S rRNA به منظور شناسایی این سویه انجام گرفت. سپس میزان تجزیه زیستی آنتراسن پس از ۹ روز توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) اندازه‌گیری شد.

یافته ها: غلظت آنتراسن در نمونه خاک ۱۸/۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد که بیشتر از حد مجاز می‌باشد. جدایه شناسایی شده به عنوان *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* سویه ATAI20 با شماره دسترسی KF113844 در پایگاه NCBI به ثبت رسید که ۳۶/۶۰ درصد از آنتراسن (با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر) را پس از ۹ روز تجزیه کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش کفایت *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* سویه ATAI20 در تجزیه زیستی هیدروکربن های آروماتیک را نشان داد. از این رو انجام پژوهش های بیشتر به منظور استفاده کاربردی از این سویه به منظور حذف زیستی آنتراسن از پساب های آلوده پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: آنتراسن، تجزیه زیستی، *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا*.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۲

مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروهی از آلاینده‌های مهم به شمار می روند که در ساختار آن‌ها دو یا چند حلقه بنزنی وجود دارد. این ترکیبات به دلیل ساختار پایدار، مقاومت بالا در برابر تجزیه و حلالیت کم در آب، از مهم ترین آلاینده های محیط زیست می باشند. ارگانیسم‌های عالی به منظور حذف یا سمیت زدایی این ترکیبات از محیط، متکی بر واکنش‌های افزایش دهنده حلالیت در آب می باشند (۱). فعالیت‌هایی با منشا طبیعی مانند آتش سوزی طبیعی جنگل‌ها و

*) آدرس برای مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۵۸۲۰ پست الکترونیک: imaneh_amini@ymail.com

فوران آتشفشان‌ها از جمله راه های ورود این ترکیبات به محیط زیست می‌باشند. فعالیت هایی با منشا انسانی مانند سوزاندن ناقص سوخت‌های فسیلی، فرآیندهای صنعتی و هم چنین سرازیر شدن محصولات نفتی از مهم ترین روش‌های انباشت این آلاینده‌ها در محیط زیست محسوب می‌گردند (۲). این ترکیبات از طریق دستگاه گوارش، تنفس و یا تماس پوستی، جذب بدن می‌شوند و موجب ایجاد موتاسیون، سرطان و تاثیرات منفی روی جنین می شوند (۳). آنتراسن با داشتن ۳ حلقه بنزنی در گروه ترکیبات PAH با وزن مولکولی پایین (LMW PAHs) قرار می گیرند. آنتراسن، بخش مهمی از زغال سنگ است و ماده ای سرطان‌زا به شمار می‌رود. آنتراسن در بین ۱۶ ترکیب PAH معرفی شده توسط آژانس حفاظت از محیط زیست ایالت متحده آمریکا (US.EPA) است که اولویت زیست – محیطی دارند (۴). تا کنون راه‌های متفاوتی مانند روش‌های شیمیایی، مکانیکی (فیزیکی) و بیولوژیکی (پاک‌سازی زیستی) به منظور پاک‌سازی ترکیبات PAH و سایر آلاینده‌ها از محیط به کار گرفته شده است. دو روش اول علاوه بر هزینه بر بودن، آلاینده را به طور کامل تخریب نمی‌کنند و موجب انتقال آلودگی از محیطی به محیط دیگر می‌گردند (۵). روش پاک‌سازی زیستی نسبت به سایر روش های پاک‌سازی مواد زائد خطرناک، ارزان‌تر و ایمن‌ترهستند و به جای انتقال آلاینده از محیطی به محیط دیگر، تخریب کامل آلاینده امکان‌پذیر می‌باشد (۶). باکتری‌ها از فعال ترین میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات PAH هستند. مطالعات پیشین نشان داده که جنس های *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *اسفنگوموناس* (*Sphingomonas*)، *بایرنکیا* (*Beijerinckia*) (۷)، *رودوکوکوس* (*Rhodococcus*) (۸)، *نوکاردیا* (*Nocardia*) و *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*) (۹) توان تجزیه آنتراسن را دارند. اگرچه جنس *نوکاردیا* در برخی از مقالات به عنوان باکتری تجزیه کننده آنتراسن معرفی شده اند. اما اطلاعات اندکی در مورد میزان تجزیه این ترکیب توسط جنس *نوکاردیا* وجود دارد. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌ای از *نوکاردیا* از خاک آلوده به نفت در منطقه پالایشگاه اصفهان و ارزیابی تجزیه زیستی آنتراسن در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها

الف) مواد شیمیایی و محیط کشت: آنتراسن (۹۶٪)، دی کلرومتان و نمک‌های محیط کشت پایه نمکی از شرکت مرک آلمان و محیط‌های کشت میکروبیولوژیکی از شرکت کویی لب کانادا تهیه شدند.

ب) نمونه برداری و آنالیزهای شیمیایی خاک: خاک آلوده به ترکیبات نفتی از منطقه پالایشگاه اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه برداری از عمق ۲۵-۱۵ سانتی‌متری سطح زمین صورت گرفت و در داخل ظرف استریل و بر روی تکه‌های یخ به آزمایشگاه منتقل شد. قبل از انجام آنالیزهای شیمیایی و میکروبی، نمونه خاک با الک دارای روزنه ۱۰ غربال شد. pH خاک به روش تهیه گل اشباع (نسبت ۱:۱ خاک و آب مقطر) با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm-827) اندازه گیری شد.

سنجش هدایت الکتریکی خاک به روش عصاره گیری از گل اشباع و سپس قرائت عدد مربوطه توسط دستگاه اندازه گیری EC (Metrohm-664) انجام گرفت. محاسبه میزان ماده آلی خاک به روش احتراق مرطوب واکلی و بلک انجام گرفت (۱۰). استخراج آنتراسن از نمونه خاک، به روش عصاره‌گیری با دستگاه سوکسله و توسط حلال دی‌کلرومتان انجام گرفت. عصاره جمع آوری شده در دستگاه تبخیر کننده چرخشی (IKA RV10) تغلیظ شد و عمل پاک‌سازی عصاره در ستون سیلیکاژل انجام گرفت (۱۱). پس از تهیه استانداردهایی با غلظت‌های متفاوت از آنتراسن، استاندارد داخلی (۹ و ۱۰ دی هیدروآنتراسن) به عصاره و استانداردهای تهیه شده افزوده و آماده تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC Agilent 6890N) شدند. این دستگاه مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (FID) و نمونه بردار خودکار به حجم ۱ میکرولیتر از هر نمونه بود. ستون HP-5 با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و فیلم داخلی ۱ میکرومتر در این دستگاه مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه کروماتوگرافی گازی به منظور تعیین غلظت

هیدروکربن‌های موجود در نمونه‌های خاک به شرح زیر بهینه گردید: جریان گاز حامل (نیتروژن)، ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. دمای آون از ۷۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد و با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۲۷۲ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای آشکارساز ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ورودی ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. اجرای کامل برنامه ۴۰ دقیقه به طول انجامید.

ج) غنی سازی و خالص سازی: به منظور جداسازی سویه تجزیه کننده آنتراسن، تکنیک غنی‌سازی در محیط کشت پایه نمکی (BSM) حاوی آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن انجام گرفت. ترکیب محیط کشت پایه نمکی شامل یک گرم KH_2PO_4، ۱/۲۵ گرم $Na_2HPO_4.12\ H_2O$، ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7\ H_2O$، ۰/۰۵ گرم $CaCl_2.6\ H_2O$ و ۰/۰۰۵ گرم $FeSO_4.7\ H_2O$ در حجم نهایی یک لیتر آب مقطر بود. پس از تنظیم pH محیط تا ۷/۲ (با استفاده از سود ۱ نرمال)، استریلیزاسیون در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. حجم مشخصی از محلول ذخیره آنتراسن در حلال دی‌کلرومتان (پس از استریل شدن توسط فیلتر های سر سرنگی) برای دست یابی به غلظت نهایی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، به ظرف استریل منتقل شد. محیط کشت پایه نمکی، پس از تبخیر حلال، به ظرف انتقال داده شد و مقدار ۱ گرم از نمونه خاک در محیط کشت تلقیح گردید. محیط کشت شاهد فاقد آنتراسن و با سه تکرار در نظر گرفته شد و غنی‌سازی نمونه‌ها بر روی انکوباتور شیکردار (Vision 8480 SFN) با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی انجام گرفت. در پایان هر هفته ۱ میلی لیتر از محیط غنی شده به محیط کشت تازه با ترکیب مشابه انتقال یافت. پس از گذشت ۵ هفته غنی‌سازی در محیط کشت مایع حاوی آنتراسن، عمل جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده این ترکیب با انتقال ۵۰۰ میکرولیتر از محیط مرحله آخر غنی‌سازی به محیط کشت نوترینت آگار انجام گرفت و سپس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد، خالص سازی کلنی‌هایی که از نظر ویژگی های میکروسکوپی و ماکروسکوپی شبیه گونه های مختلف *نوکاردیا* بودند (باکتری های رشته ای با کلنی‌های خشن) به روش کشت خطی انجام گردید (۱۲ و ۱۳).

د) شناسایی بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی جدایه: بررسی ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه و هم چنین برخی از آزمون های بیوشیمیایی مانند هیدرولیز اوره، مصرف سیترات، احیای نیترات و تخمیر برخی از کربوهیدرات ها، به منظور شناسایی اولیه سویه مورد مطالعه و آنالیز توالی ژن 16S rRNA برای تایید شناسایی انجام گرفت (۱۴). استخراج DNA به روش ستیل تری‌متیل‌آمونیوم برماید (CTAB) انجام شد (۱۵). به منظورتکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی 27-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1492-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3') استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۴ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر DNA و آب مقطر تزریقی بود. تمامی مواد مورد استفاده از شرکت سیناژن ایران تهیه شد.

تنظیم برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر (Eppendorph) به صورت: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۱ دقیقه واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ ثانیه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه طویل‌سازی نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۶). به منظور نظارت بر کیفیت محصول PCR، الکتروفورز آن بر روی ژل ۱ درصد انجام گرفت و سپس برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. توالی‌های نوکلئوتیدی به کمک نرم افزار Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفتند و همولوژی آن‌ها با اطلاعات موجود در GenBank مقایسه و ثبت شد.

ه) تعیین حداکثر غلظت قابل تحمل (MTC): غلظت آنتراسن در داخل محیط کشت از مقدار اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت های بالاتر (تا حد توقف رشد جدایه ها) افزایش داده شد. در هر مرحله برای اطمینان از عدم رشد جدایه در لوله‌های فاقد کدورت، انتقال به محیط کشت نوترینت آگار صورت گرفت (۱۷).

و) ارزیابی تجزیه زیستی: برای مطالعه فرآیند تجزیه زیستی از محیط کشت پایه نمکی مایع واجد ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن استفاده شد. به این منظور کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند از سویه تهیه و مقدار ۱ میلی لیتر از این کدورت به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت تلقیح شد. گرما گذاری نمونه‌های تلقیح شده (۳ تکرار) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به همراه نمونه کنترل فاقد تلقیح به مدت ۹ روز بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. محیط کشت کنترل فاقد تلقیح، به منظور سنجش میزان تجزیه آنتراسن در اثر عوامل غیرزیستی در نظر گرفته شد. سپس استخراج آنتراسن از ۱۰ میلی‌لیتر محیط با فواصل ۳ روز به روش استخراج مایع- مایع در دو مرحله توسط ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان انجام گرفت. عصاره‌های حاصل توسط سولفات سدیم فعال شده، آب زدایی شد و پس از خشک شدن با جریان گاز ازت، توسط حلال دی کلرومتان به حجم ۲ میلی لیتر رسیدند و آماده تزریق به دستگاه GC شدند (۱۸).

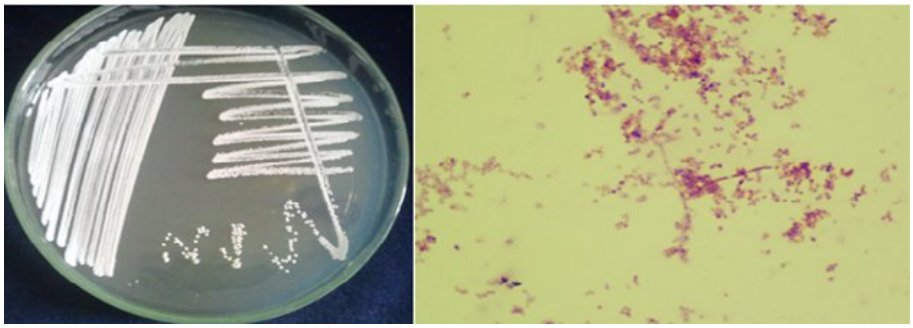
سپس محلول‌های استاندارد آنتراسن در محدوده غلظت‌های ۱۲۵ تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در حلال دی کلرومتان تهیه شد. قبل از تزریق به دستگاه، حجم مشخصی از غلظت معین استاندارد داخلی اسنفتن به نمونه‌های عصاره‌گیری شده و استانداردها افزوده شد. نمونه ها توسط نمونه بردار خودکار و با حجم ۱ میکرولیتر به دستگاه تزریق شدند. شرایط بهینه شده برنامه دستگاه GC به شرح زیر بود: جریان گاز حامل (نیتروژن) ، ۱/۶ میلی‌لیتر در دقیقه در نظر گرفته شد. دمای آون از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد و با سرعت ۷ درجه در دقیقه به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای آشکارساز و ورودی، ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کل زمان اجرای برنامه ۲۰ دقیقه به طول انجامید.

یافته ها

الف) ویژگی‌های شیمیایی نمونه خاک: نمونه خاک مورد نظر دارای pH خنثی (۷/۳۴) و هدایت الکتریکی ۳/۲۶ دسی زیمنس بر متر بود. میزان ماده آلی و غلظت آنتراسن در این خاک به ترتیب ۵/۰۴ درصد و ۱۸/۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند.

ب) خالص سازی و شناسایی جدایه ها: پس از ۵ هفته غنی سازی در حضور آنتراسن، ۷ سویه باکتریایی از نمونه خاک جداسازی شدند. تنها یکی از آن ها از نظر ویژگی های مورفولوژیکی به جنس *نوکاردیا* شباهت داشت. این جدایه کلنی های کوچک، برجسته، خشن و سفید گچی داشت و به صورت باکتری رشته‌ای، گرم مثبت و کوکسی شکل مشاهده شد (شکل ۱). در جدول ۱، ویژگی های بیوشیمیایی این جدایه نشان داده شده است.

پس از آنالیز توالی ژن *16S rRNA* این جدایه به عنوان



شکل ۱: ویژگی ماکروسکوپی و میکروسکوپی *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* سویه ATAI20

جدول ۱: نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه مورد پژوهش

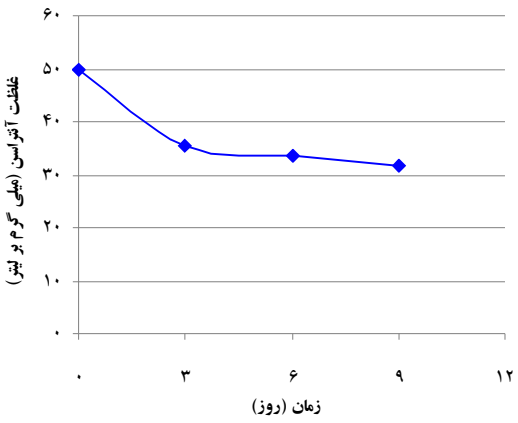
آزمون بیوشیمیایی	سویه ATAI20
تست پتاسیم هیدروکسید (KOH)	-
رنگ آمیزی اسید فاست	+
کاتالاز	+
اکسیداز	-
احیای نیترات	+
هیدرولیز اوره	+
تحرک	-
مصرف سیترات	-
هیدرولیز نشاسته	-
تخمیر گلوکز	-
تخمیر ترهالوز	-
تخمیر رامنوز	-
تخمیر مالتوز	-
رشد در دمای ۴۵°C	-

نوکاردیا سیریاسیجورجیکا (*Nocardia cyriacigeorgica*) سویه ATAI20 شناسایی شد. توالی این ژن با شماره دسترسی KF113844 در پایگاه GenBank به ثبت رسید.

ج) تجزیه زیستی آنتراسن: سویه ATAI20 تا غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن را تحمل کرد. اما حداکثر میزان کدورت این سویه در طول موج ۶۰۰ نانومتر در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد. غلظت آنتراسن در فواصل ۳ روز گرماگذاری سویه ATAI20 در محیط کشت واجد این ترکیب از مقدار اولیه ۵۰ میلی گرم بر لیتر به مقادیر ۳۵/۳۰، ۳۳/۷۰ و ۳۱/۷۰ میلی گرم بر لیتر رسید (نمودار ۱). میزان تجزیه زیستی آنتراسن پس از این مدت ۳۶/۶۰ درصد و میزان تجزیه این ترکیب در اثر عوامل غیر زیستی ۸/۰۴ درصد برآورد شد.

بحث

غلظت مجاز ترکیبات PAH در خاک اطراف مناطق صنعتی بین ۱ تا ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۱۹). در مطالعه حاضر با توجه به این که غلظت آنتراسن در نمونه



نمودار ۱: تغییرات غلظت آنتراسن در محیط کشت سویه ATAI20 در فواصل ۳ روز

خاک (۱۸/۴۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیشتر از حد مجاز ذکر شده بود. از این رو این نمونه به عنوان خاک آلوده در نظر گرفته شد.

اعضای جنس *نوکاردیا* در گروه اکتینومیست هایی قرار دارند که هیف‌های منشعب آن‌ها اغلب به صورت اشکال میله‌ای یا کوکسی شکل مشاهده می‌شود. باکتری‌های متعلق به این جنس، غیر متحرک هستند و به دلیل وجود مایکولیک اسید در دیواره سلولی در گروه باکتری‌های اسید فاست طبقه بندی می‌شوند (۲۰). در این مطالعه سویه *جدیدی از نوکاردیا سیریا سیجورجیکا* با توانایی تجزیه آنتراسن از خاک آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی شد. در بین گونه‌های مختلف این جنس، *نوکاردیا آستروئیدس* (*Nocardia asteroides*) شباهت فراوانی از نظر مورفولوژیکی و واکنش‌های بیوشیمیایی با *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* دارد. از جمله آزمون‌هایی که در افتراق این دو گونه مورد توجه قرار می‌گیرند می‌توان به رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و هیدرولیز اوره اشاره نمود (۲۱ و ۲۲). در مطالعه حاضر باکتری *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* سویه ATAI20، ۳۶/۶۰ درصد آنتراسن (با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) را پس از ۹ روز تجزیه کرد. اگرچه سویه ATAI20 قادر به رشد در غلظت‌های بالاتر آنتراسن (تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نیز بود، اما حداکثر میزان رشد این سویه

در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (غلظت آنتراسن در مرحله غنی‌سازی) مشاهده شد. توالی ژن 16S rRNA در سویه ATAI20، ۹۸ درصد با توالی این ژن در *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* سویه‌های GUH-2 و DSM-44484 شباهت نشان داد. همچنین در مطالعه نی-کانگ (Nhi-Cong) و همکاران در سال ۲۰۱۰ جداسازی باکتری *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* از خاک آلوده به نفت کویری در عربستان سعودی گزارش شده است (۲۳). در مطالعه یاد شده این جدایه توانایی استفاده از هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک را داشت. زینعلی (Zeinali) و همکاران در سال ۲۰۰۷ باکتری *نوکاردیا اتیتیدیس کاویاروم* سویه TSH1 را از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی جدا سازی کردند (۲۴). که میزان تجزیه فنانترن و آنتراسن (با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) توسط این باکتری پس از ۷ روز به ترتیب ۹۰ و ۲۵ درصد گزارش شد. در مطالعه زینعلی (Zeinali) و همکاران با وجود این‌که غلظت اولیه آنتراسن ۱۰ برابر غلظت این ترکیب در مطالعه حاضر بود، اما این جدایه میزان تجزیه زیستی قابل قبولی را داشت. احتمالاً دلیل این مساله، علاوه بر تفاوت توانایی گونه های مختلف *نوکاردیا* در تجزیه آنتراسن، می تواند به تفاوت در غلظت اولیه این ترکیب ارتباط داشته باشد. به طوری که سویه TSH1 در مرحله غنی‌سازی در حضور غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر جداسازی شد. از این رو توانایی تحمل و تجزیه غلظت بالاتری را نسبت به سویه ATAI20 (که در حضور ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتراسن جدا سازی شده بود) داشت. از طرف دیگر با توجه به ترموفیل بودن سویه TSH1، بهینه سازی دمای گرمخانه گذاری این سویه (۵۰ درجه سانتی‌گراد) تجزیه زیستی بیشتر آنتراسن نسبت به مطالعه را به دنبال داشت.

در مطالعه بایک (Baek) و همکاران در سال ۲۰۰۶ سویه‌ای از جنس نوکاردیا جداسازی شد که به ترتیب ۰/۱ ± ۰/۹۹ و ۰/۸ ± ۸/۲۳ درصد از هیدروکربن های آلیفاتیک و آروماتیک را پس از ۶ روز تجزیه کرد (۲۵). همچنین جداسازی باکتری‌های متعلق به جنس *نوکاردیا* دارای قابلیت تجزیه نفتالن و پیرن، به ترتیب از خاک آلوده به نفت در کشور ایتالیا (۲۶) و منطقه دفن زباله ها در شیراز (۲۷) گزارش شده است.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری *نوکاردیا سیریاسیجورجیکا* توانایی قابل ملاحظه‌ای در تجزیه هیدروکربن های آروماتیک دارد. در مطالعه حاضر سویه ATAI20 نیز به عنوان یکی از تجزیه کنندگان آنتراسن مطرح شد و به نظر می‌رسد همکاری این سویه با سایر باکتری ها یا میکروارگانیسم های دیگر تاثیر بسزایی در تجزیه آنتراسن و سایر هیدروکربن ها داشته باشد. از این رو انجام پژوهش های تکمیلی در مورد ارزیابی نقش هم افزایی سویه های مختلف تجزیه کننده انتراسین پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Lease CW. Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by defined bacterial and fungal cocultures. Flinders University, School of Biological Sciences; 2006.

2. John R, Essien J, Akpan S, Okpokwasili G. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. Bull environ contam toxico. 2012; 88(6):

1014-1019.

3. Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. Acta Pol Pharm. 2004;61(3): 233-240.

4. Wick AF, Haus NW, Sukkariyah BF, Haering KC, Daniels WL. Remediation of PAH- contaminated soils and sediments: a literature review. Virginia Polytechnic Institute and State University. 2011.

5. Haritash A, Kaushik C. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater. 2009;169(1): 1-15.

6. Arun K, Ashok M, Rajesh S. Crude oil PAH constitution, degradation pathway and associated bioremediation microflora: an overview. Int J Environ Sci. 2011; 1(7): 1420-1439.

7. Seo J-S, Keum Y-S, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res Public Health. 2009; 6(1): 278-309.

8. Leneva N, Kolomytseva M, Baskunov B, Golovleva L. Phenanthrene and anthracene degradation by microorganisms of the genus *Rhodococcus*. Appl Biochem Microbiol. 2009; 45(2): 169-175.

9. van Herwijnen R, Springael D, Slot P, Govers HA, Parsons JR. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through o-phthalic acid. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(1): 186-190.

10. Carter MR. Soil sampling and methods of analysis. CRC Press; 1993.

11. Rasdy NFA, Sanagi MM, Ibrahim WAW, Naim AA. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in palm oil mill effluent by soxhlet extraction and gas chromatography-flame ionization detection. Malaysian J Anal Sci. 2008; 12(1): 16-21.

12. Tian Y, Liu H, Zheng T, Kwon K, Kim S, Yan C. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. Mar Pollut Bull. 2008; 57(6): 707-715.

13. Ma B, Chen H-h, He Y, Xu J-m, editors. Isolations and consortia of PAH-degrading bacteria from the rhizosphere of four crops in PAH-contaminated field. ^{19}th World Congress of Soil Science; 2010.

14. Dworkin M, Falkow S. The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes: Springer Verlag; 2006.

15. DeSalle R, Giribet G, Wheeler W. Techniques in molecular systematics and evolution: Springer; 2002.

16. Madueño L, Coppotelli B, Alvarez H, Morelli I. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. Int Biodeterior Biodegrad. 2011; 65(2): 345-351.

17. Bennett R M, Dagamac N H A, Fernandez E V M, Uba M O, W CM. In vitro degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. GIPAH-01 isolated from Guimaras island, Philippines.

Asian J Exp Biol Sci. 2012; 3(4): 682-687.

18. Shokrollahzadeh S, Golmohammad F, Shokouhi H. Study of sphingopyxis isolates in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Chem Eng Trans. 2012; 27: 55-60.

19. World Health Organization /International Program on Chemical Safety (WHO/IPCS). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. 1998 Environmental health criteria ; 202. Geneva : World Health Organization.

20. Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45(2): 240-245.

21. Yassin A, Rainey F, Steiner U. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(4): 1419-1423.

22. Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P. *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. J Clin Microbiol. 2008; 46(1): 265-273.

23. Nhi-Cong LT, Mikolasch A, Awe S, Sheikhany H, Klenk HP, Schauer F. Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by Nocardia cyriacigeorgica isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. J Basic Microbiol. 2010; 50(3): 241-253.

24. Zeinali M, Vossoughi M, Ardestani S. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. Lett Appl Microbiol. 2007; 45(6): 622-628.

25. Baek K-H, Yoon B-D, Oh H-M, Kim H-S, Lee I-S. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Nocardia* sp. H17-1. Geomicrobiol J. 2006; 23(5): 253-259.

26. Alquati C, Papacchini M, Riccardi C, Spicaglia S, Bestetti G. Diversity of naphthalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil. Ann Microbiol. 2005; 55(4): 237-242.

27. Kafilzadeh F, Hoshyaripour F, Afrough R, Jamali H, Allahverdi G. Isolation and Identification of pyrene-degrading bacteria from soils around landfills in Shiraz and their growth kinetic assay. J Fasa Uni Med Sci. 2011; 1(3): 154-159. [In Persian]

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Isolation, molecular identification & anthracene biodegradation of *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil refinery soil in Isfahan

Imaneh Amini[1], Arezoo Tahmourespour[2], Atousa Abdollahi[2], Monir Doudi[3]

[1] MSc, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Basic Science, Islamic Azad University, Khorasgan (Isfahan) Branch, Isfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of non-polar compounds that are categorized as one of main environmental concerns due to their highly toxicity and persistent in the environment. Biodegradation of such pollutants is a safe inexpensive clean up method. This study was aimed to isolation and molecular identification of a *Nocardia* strain with the ability to degrade anthracene in vitro condition.

Material & methods: Petroleum contaminated soil sample was collected from Isfahan refinery and some chemical properties of sample were measured. Anthracene degrading bacteria were isolated by the enrichment culture technique in basal salt medium with 50 mg/l anthracene. Only one isolate with similar morphology to *Nocardia* sp was selected. Identification of isolate was done based on biochemical tests and *16S rRNA* gene analyses. Then, the biodegradation rate of anthracene was measured after 9 days by Gas chromatography (GC).

Results: Anthracene concentration in soil sample was 18.48 mg/kg that is more than allowable concentration. Isolate was recorded as *Nocardia cyriacigeorgica* ATAI20 in the NCBI database under accession number KF113844. Biodegradation of anthracene (50 mg/l) was 36.60% after 9 days.

Conclusion: Based on this study, *Nocardia cyriacigeorgica* ATAI20 was actively able to degrade aromatic hydrocarbons. Therefore, further studies would be useful for commercial application of this strain in bioremediation of antheracene from polluted wastewaters.

Keywords: Anthracene, Biodegradation, *Nocardia cyriacigeorgica.*

Correspondence to: Imaneh Amini

Tel: +989132005820

E-mail: imaneh_amini@ymail.com

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 228-236.