

## جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده آنتراسن از آب و رسوبات آلوده در دریاچه مهارلو

فرشید کفیل زاده<sup>۱\*</sup>

[Kafilzadeh@jia.ac.ir](mailto:Kafilzadeh@jia.ac.ir)

سمیه بهزادی شهر بابک<sup>۲</sup>

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** هیدروکربن های چندحلقه ای (PAHs)، دسته ای از ترکیبات آروماتیک با حلقه های به هم پیوسته می باشند که در نتیجه احتراق ناقص سوخت های فسیلی و دیگر ترکیبات آلی، از طریق پساب کارخانه های تولید کک (Coke)، پالایشگاه های نفت و صنایعی که از درجه حرارت های بسیار بالا استفاده می کنند، وارد محیط زیست می گردند. امروزه تجزیه بیولوژیک این ترکیبات توسط میکروارگانیسم ها، مطمئن ترین و بهترین راه مبارزه با این آلودگی ها است و باکتری ها به علت داشتن آنزیم های متنوع بر دیگر ارگانیسم ها ارجحیت دارند. یکی از ترکیبات آروماتیک، آنتراسن می باشد. آنتراسن یک ترکیب سه حلقه ای جامد و ایزومر فناترن است. آنتراسن منبع اصلی و پایه رنگ های آنتراکینون و آلیزارین می باشد. این ماده از تقطیر زغال سنگ و احتراق ناقص سوخت های فسیلی حاصل شده و در مراکز صنعتی به وفور یافت می شود. در این تحقیق به منظور تعیین میزان تجزیه باکتریولوژیک آنتراسن، به شناسایی باکتری های تجزیه کننده آنتراسن در دریاچه مهارلو و هم چنین تعیین میزان تجزیه این ماده در حضور عامل pH پرداخته شده است.

**مواد و روش ها:** در این بررسی جداسازی باکتری های گرم منفی تجزیه کننده آنتراسن از آب و رسوب دریاچه مهارلو انجام گردید. نمونه برداری از ۴ ایستگاه و در فصل بهار انجام شد. نمونه ها پس از صاف شدن، در محیط پایه حاوی ترکیبات معدنی، عناصر کمیاب و آنتراسن کشت داده شده و پس از کشت های متوالی در محیط های اختصاصی و انجام تست های اولیه و بیوشیمیایی، باکتری های گرم منفی جدا و در حد جنس و گونه شناسایی شدند. پس از آن تأثیر pH، بر روند تجزیه بررسی شد.

**یافته ها و نتایج:** باکتری هایی که از این بررسی به دست آمدند شامل جنس های سودوموناس، نوکاردیا، ایروموناس و اسینتوباکتر بودند. از این تعداد باکتری ها که به دست آمدند، بیشترین تعداد مربوط به مصب رودخانه خشک با فراوانی ۲۶/۵٪ و کمترین آن مربوط به وسط دریاچه بود. با توجه به پراکنش بیشتر سودوموناس نسبت به بقیه باکتری ها می توان آن را به عنوان گونه شاخص تجزیه کننده آنتراسن در نظر گرفت. با بررسی تأثیر pH بر روند تجزیه آنتراسن، مشخص شد که حلالیت آنتراسن در pH = ۵/۵، pH بیش از ۷ و pH = ۸/۸ بوده و در نتیجه میزان تجزیه این سوبسترا توسط باکتری نیز در pH = ۵/۵ بیشتر بوده است.

با توجه به توانایی باکتری ها در تجزیه آنتراسن و تأثیر pH در روند تجزیه، می توان با به کار گیری باکتری ها و ایجاد شرایط بهینه، توانایی آن ها را در تجزیه این قبیل سوبستراها افزایش داده و در نتیجه به محیطی سالم و به دور از این آلاینده ها دست یافت.

**واژه های کلیدی:** آنتراسن، سودوموناس، باکتری های گرم منفی، تجزیه بیولوژیک، هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای

۱- دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران \* (مسئول مکاتبات).

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران

## مقدمه

رساندن به شرایط قابل قبول، نیاز به میکروارگانیسم های مناسب دارند. لذا تهیه استارتر کالچرهای میکروبی و استفاده صنعتی از آن ها یکی از راه حل های مناسب و سریع در تصفیه این پساب ها می باشد. وجود آنتراسن در پساب های صنعتی کارخانه های تولید و یا مصرف کننده آنتراسن باعث افزایش  $BOD^1$  و  $COD^2$  می گردد که تصفیه بیولوژیکی یکی از راه حل های مناسب برای این مشکل است.

آنتراسن یک هیدروکربن سه حلقه ای و جامد می باشد. اسامی دیگر این ماده عبارت از آنتراسین، روغن سبز و پارا آنترانل می باشد (۳). آنتراسن در صورت خلوص، بی رنگ با فلئورسانس بنفش و در صورت ناخالصی به علت وجود تتراسن و نفتاسن، زردرنگ با فلئورسانس سبز دیده می شود. آنتراسن منبع اصلی و پایه رنگ های آنتراکینون و آلیزارین است (۴).

این ماده از تقطیر زغال سنگ و احتراق ناقص سوخت های فسیلی حاصل شده و در هوای مناطق شهری و صنعتی به فراوانی یافت می شود (۲). وجود مقادیر بالای این ترکیب در پساب بسیاری از کارخانه های صنعتی که به این رودخانه ها و سپس دریاچه ریخته می شود، به دلیل خاصیت ضد میکروبی و مقاومت به تجزیه، مدت طولانی باقی می ماند و باعث مرگ میکروارگانیسم های محیطی و به هم خوردن شدید اکوسیستم محیط می گردد (۵). از طرفی تجمع آنتراسن در بافت های حیوانی باعث سمیت و سرطان زایی در جانوران دریایی می شود (۴).

در این پژوهش سعی گردید میکروارگانیسم های مقاوم تجزیه کننده آنتراسن جداسازی گردد. با جداسازی این باکتری ها و تهیه کلکسیون میکروبی و استفاده از آن ها می توان گامی بزرگ در جهت کاهش آلاینده های محیطی این دریاچه و تبدیل آن به یک اکوسیستم سالم و دور از هر گونه آلودگی برداشت.

## روش بررسی

**ایستگاه های نمونه برداری:** در این تحقیق از آب و رسوب ۴ ایستگاه مختلف نمونه برداری شد که عبارتند از:  
 ۱- مصب رودخانه خشک. ۲- مصب رودخانه پل فسا. ۳- مصب رودخانه نظرآباد سروستان و ۴- وسط دریاچه.  
 نمونه برداری با شیشه های استریل و از عمق حدود ۵۰ سانتی متری آب و ۵-۰ سانتی متری رسوب انجام شد (نمونه برداری از رسوب با استفاده از Grab Sampler صورت گرفت).

دریاچه مهارلو در ۲۳ کیلومتری جنوب شرقی شیراز بین عرض های ۲۹/۱۸ و ۲۹/۳۲ شمالی و طول های ۵۲/۴۲ و ۵۲/۵۸ شرقی قرار گرفته است. طول دریاچه ۳۱ کیلومتر و حداکثر پهنای آن ۱۱ کیلومتر است. این حوزه تحت تاثیر آب های ورودی و نیز تبخیر، نوساناتی را متحمل می شود که از خصوصیات دریاچه بسته است (۱). دریاچه مهارلو از شمال غرب و جنوب شرق به ترتیب به دشت های شیراز و سروستان محدود شده و نواحی اطراف دریاچه را ارتفاعات تشکیل می دهند. دریاچه مهارلو تحت تاثیر آب رودخانه های خشک شیراز، رودخانه پل فسا و رودخانه نظرآباد سروستان می باشد که بیشتر آلاینده های این دریاچه نیز از طریق آب همین رودخانه ها وارد دریاچه می شود.

**رودخانه خشک:** مساحت حوزه آبریز این رودخانه حدود ۸۰۰ کیلومتر مربع است که بالغ بر ۳۰ میلیون متر مکعب آب درفصول بارانی و زمستانی وارد این رودخانه می شود. میزان حجم فاضلاب تولیدی سالانه شهر شیراز بالغ بر ۵۳ میلیون متر مکعب می باشد. از این مقدار ۲۰ میلیون متر مکعب آن از طریق فاضلاب های مراکز مجاور رودخانه و خارج از محدوده به رودخانه خشک تخلیه می گردد که قسمت اعظم این فاضلاب وارد دریاچه مهارلو می شود (۱).

منابع آلوده کننده که فاضلاب خود را از طریق این رودخانه وارد دریاچه می کنند، شامل واحدهای درمانی، آموزشی، گرمابه ها، واحدهای تولیدی، مجتمع مسکونی، هتل ها، کارخانه پتروشیمی، صنایع و ... می باشد.

**رودخانه پل فسا:** که حوزه آبریز آن ۲۱۸ کیلومتر مربع است و حدود ۲۰ میلیون متر مکعب آب به همراه آلاینده های شیمیایی از طریق این رودخانه به دریاچه مهارلو سرازیر می گردد. **رودخانه نظرآباد سروستان:** که حوزه آبریز آن در حدود ۸۰۰ کیلومترمربع است و حدود ۱۰ میلیون مترمکعب آب وارد دریاچه مهارلو می کند (۱).

قسمت اعظم PAHs از جمله آنتراسن از طریق کارخانه پتروشیمی، کارخانه تولید رنگ، کارخانه های تولید مواد دارویی و آرایشی و ... که فاضلاب های خود را به این رودخانه ها می ریزند وارد دریاچه می شود.

غلظت PAHs (آنتراسن) در آب و رسوب بستگی به فاصله آب یا رسوب از منبع آلوده کننده دارد و بیشترین غلظت آن در آب و رسوب نزدیک مصب رود می باشد (۲).

حفظ محیط زیست یکی از مسایل مهمی است که همیشه مورد توجه بشر بوده است. یکی از عمده آلوده کننده های محیط زیست، پساب های صنعتی کارخانه ها می باشد که برای تصفیه و

1 - Biological Oxigene Demand

2 - Chemical Oxigene Demand

کاتالاز، اکسیداز، گلوکز و رشد بر روی محیط مک کانکی (Macconkey Agar) استفاده شد. سپس با استفاده از جدول تست های تشخیصی، شناسایی باکتری ها انجام گرفت (۶). برای بررسی تأثیر pH بر روند تجزیه، از سه pH ۵/۵، ۷ و ۸/۸ استفاده گردید، سپس بهترین سویه تجزیه کننده آنتراسن در آن ها تلقیح و میزان تجزیه آنتراسن در زمان های مختلف محاسبه شد.

#### نتایج

بر پایه آزمون های میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی، باکتری های گرم منفی تجزیه کننده آنتراسن جداسازی شده از آب و رسوب دریاچه مهارلو شامل سویه های مختلف سودوموناس، اسینتوباکتر، ایروموناس، ویبریو و نوکاردیا بوده که با رنگ آمیزی گرم و تست پتاس ۳ درصد از باکتری های گرم مثبت جدا گردیدند. برخی از این باکتری ها قادر بودند که آنتراسن را به طور کامل تجزیه کنند (سودوموناس) و برخی به میزان کمتر تجزیه کردند.

از ۴۰ نمونه باکتری ایزوله شده ۲۵ مورد متعلق به باکتری های گرم منفی (%۶۲/۵) و ۱۵ نمونه مربوط به باکتری های گرم مثبت بود (%۳۷/۵) (شکل ۲).

در مقایسه ایستگاه های مختلف از نظر پراکنش باکتری های گرم منفی تجزیه کننده، مشخص گردید که مصب رودخانه خشک دارای بیشترین تعداد باکتری (۱۳ گونه باکتری گرم منفی یا %۵۲) بود و کمترین تعداد باکتری مربوط به وسط دریاچه (%۸) می باشد (شکل شماره ۱).

علت نمونه برداری از عمق ۵۰ سانتی متری آب، به علت آلودگی بیشتر آب در این عمق بوده و احتمال می رود که میکروب های تجزیه کننده در روی سطح آب قرار نداشته باشند.

نمونه های جمع آوری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

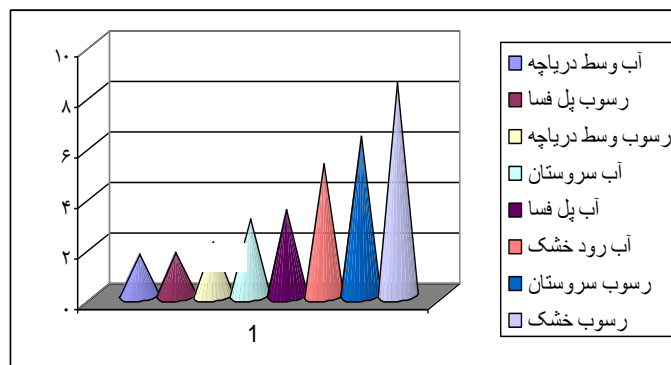
#### جداسازی باکتری های تجزیه کننده آنتراسن برای

جداسازی باکتری ها از محیط پایه معدنی حاوی ترکیبات معدنی، از عناصر کمیاب و آنتراسن (آنتراسن با محدوده شیب غلظت، از تراکم ۱۰۰ تا ۸۰۰ ppm با فواصل ۱۰۰ تایی) استفاده شد. باکتری های تجزیه کننده را از طریق هاله ای که در اثر مصرف سوپسترا در اطراف هر کلنی ایجاد شده می توان مشخص نمود. باکتری هایی که در حداقل زمان ممکن شروع به رشد نموده و نیز از حداکثر کدورت در مجاورت ماده آروماتیک برخوردار بودند، به عنوان سویه های میکروبی مناسب انتخاب گردیدند.

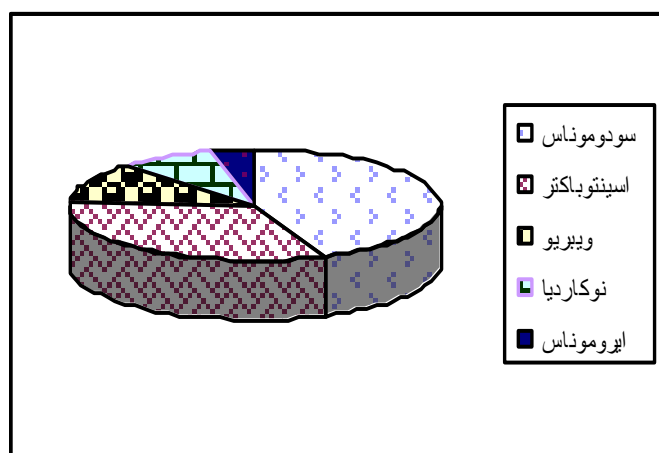
به منظور پراکندگی باکتری های تجزیه کننده آنتراسن در نمونه های مختلف جمع آوری شده، اقدام به شمارش این جمعیت باکتریایی در هر نمونه شد. کلنی های مربوط به هر نمونه شمارش و نتایج بر اساس CFU/g (نمونه رسوب) و یا CFU/ml (نمونه آب) بیان گردید.

به منظور شناسایی باکتری های جدا شده، ابتدا باکتری های گرم منفی را با استفاده از رنگ آمیزی گرم و نیز تست %۳ KOH، از باکتری های گرم مثبت جدا کرده و بعد از چهار تست کلیدی

CFU/g(ml)



شکل ۱- پراکندگی باکتری ها در مناطق مختلف



شکل ۲- فراوانی باکتری های مختلف

با روش تکرار کشت از محیط جامد به مایع، بهترین و قوی ترین سویه، سودوموناس ایروژینوزا شناخته شد. (جدول ۱).

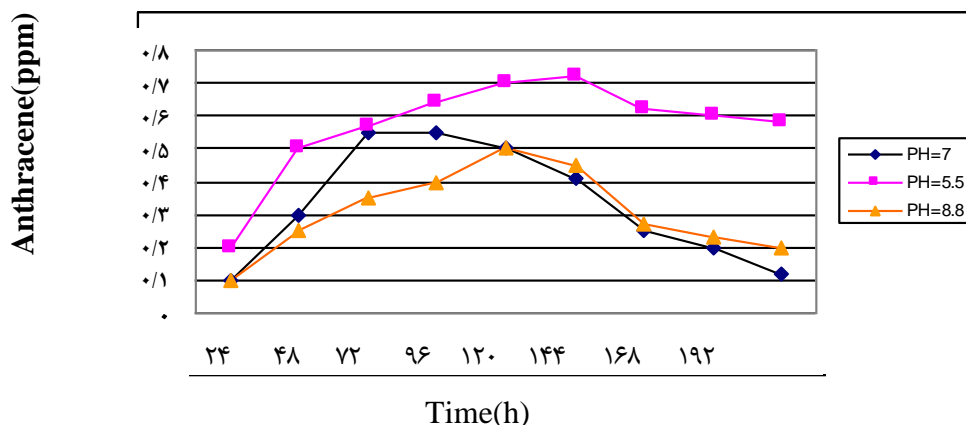
جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی سودوموناس

خصوصیات بیوشیمیایی سودوموناس	
+	حرکت-تاژه
-	گاز از گلوکز
اکسیداتیو	فرمانتاتیو یا اکسیداز
+	OF
+	گزیلوز
-	مانیتول
-	لاکتوز
-	سوکروز
+	مالتوز
+	کاتالاز
+	اکسیداز
+	مک کانکی
+	SS
+	سیمون سترات
+	اوره
+	احیائیترات
-	TSI(sland-acid)
-	TSI(butt-acid)
-	H <sub>2</sub> S(TSI-butt)
-	اندول
-	هیدرولیز ژلاتین



۹۶ و ۱۴۴ ساعت، به ترتیب ، ۱۲/۲۸٪ و ۶۰/۸۶٪ از آنتراسن موجود در فاز آبی محیط کشت را به مصرف می‌رساند ( نمودار ۵).

ترتیب، ۴۱/۶۶٪ و ۲۷/۸۴٪ کاهش نشان می‌دهد. در چنین شرایطی (pH=۸/۸) ، رشد باکتری پس از ۴۰ ساعت آغاز شده و پس از



نمودار ۵- تغییرات غلظت آنتراسن در فاز آبی محیط کشت باکتری سودوموناس (۵۰۰ppm آنتراسن) در pH=۵/۵، ۷، ۸/۸

#### بحث و نتیجه گیری

درصد بالاتر نمک نشان می‌دهد. در این تحقیق چند جنس باکتری گرم منفی جداسازی و شناسایی شد که مهم‌ترین آن سودوموناس بود. سودوموناس دارای بیشترین پراکنش در مکان‌های نمونه برداری می‌باشد و نیز بیشترین تجزیه را نسبت به سایر باکتری‌ها داراست.

با این حال عوامل بیولوژیک و غیر بیولوژیک نیز بر روند تجزیه آنتراسن اثر می‌گذارد. این عوامل شامل وجود میکروارگانیسم‌های مختلف در محیط، غلظت نمک، pH، دما، وجود مواد مغذی و نیز حضور آلودگی‌های دیگر از جمله حضور فلزات سنگین در محیط است که می‌تواند بر روند تجزیه اثر گذارد (۹) و نیاز به مطالعات بیشتر در مقیاس‌های آزمایشگاهی با غلظت‌های مختلف آنتراسن دارد. از آنجایی که غلظت ترکیبات آروماتیک از جمله آنتراسن در رسوبات بیشتر از آب‌های سطحی است (۲)، می‌توان ادعا نمود که تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نیز در رسوبات به مراتب بیشتر از آب‌های سطحی می‌باشد. باکتری‌هایی که در رسوبات وجود دارند توانایی زنده ماندن در شرایط بی‌هوازی را داشته و موجودات بنتیکی که در رسوبات وجود دارند با تحرک خود، اکسیژن در اختیار آن‌ها قرار داده و باکتری‌های تجزیه‌کننده فعالیت خود را انجام می‌دهد. البته تجزیه ترکیبات آروماتیک از جمله آنتراسن در رسوبات کندتر صورت می‌گیرد که علت آن مقدار کم اکسیژن است (۱۰).

Bauer و Capone (۱۹۸۵) تجزیه بیولوژیک آنتراسن را توسط فلور میکروبی رسوبات در آزمایشگاه مورد بررسی قرار دادند

به طور کلی میکروارگانیسم‌های مختلفی قادر به تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک می‌باشند که در بین آن‌ها باکتری‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۷).

باکتری‌ها به علت داشتن آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند. هر چه تعداد حلقه‌های آروماتیک هیدروکربن‌ها بیشتر باشد، تجزیه آن‌ها کمتر و کندتر صورت می‌گیرد (۸). به علت این‌که PAHs از جمله آنتراسن تمایل به جذب ذرات (خصوصاً ذرات آلی) و ته نشین شدن دارند، غلظت آن‌ها در رسوبات بیشتر از آب می‌باشد و هر چه وزن ملکولی PAH بیشتر باشد، به علت حلالیت کمتر آن در آب، تجمعش در رسوبات بیشتر است و به تبع آن تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده آنتراسن هم که از آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند در این مکان‌ها بیشتر است.

باکتری‌های مختلفی قادرند که از آنتراسن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده کنند که در این میان باکتری‌های گرم منفی به علت تنوع بیشتر مهم‌ترند (۸).

با این حال باکتری‌های گرم مثبت نیز به علت پایداری و مقاومت بیشتر نسبت به باکتری‌های گرم منفی به خصوص در محیط‌های آبی (دریا و دریاچه) از اهمیت خاصی برخوردارند. در این بررسی تعدادی باکتری گرم مثبت نیز علاوه بر باکتری‌های گرم منفی جداسازی شدند که بیشتر آن‌ها مربوط به نمونه‌های وسط دریاچه می‌باشد. این پایداری باکتری‌های گرم مثبت را نسبت به

6. Holt JG, Keriy NR, Sneath PHA, Staley JT and Williams ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins.
  7. Kiyohara H, Nagao K, Kouno K and Yano K. 1982. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl Environ Microbiol.* 43(2): 458-461.
  8. Rosenberg E, Perry A, Gibson DT and Gutnick DL. 1979. Emulsifiers of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. *Appl Environ Microbiol.* 37(3): 409-413.
  9. Wodzinski, R.S., and Johnson, M. J. 1968. Yields of bacterial cells from hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 27:1081-1084.
  10. Richardson ML. 1992. The Dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
  11. Bauer JE and Capone DG. 1985. Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 50(1): 81-90.
  12. Davies JI, and Evans, W.C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. *Biochem J.* 91(2): 251-261.
- (۱۱). در این مورد نیز در غیاب اکسیژن، تجزیه آنتراسن دیده نشد. سرعت و مقدار کل معدنی شدن به شدت وابسته به مقدار اکسیژن و درجه حرارت انکوباسیون و نیز غلظت آنتراسن موجود در محیط می باشد.
- Evans و Davies (۱۹۶۴) واکنش های اولیه در تجزیه باکتریایی آنتراسن را مستلزم اکسیژناسیون موقعیت های ۱ و ۲ و تشکیل سیس -۱ و ۲- دی هیدروکسی ۱ و ۲ دی هیدرو آنتراسن و متعاقب آن تشکیل ۱ و ۲ دی هیدروکسی آنتراسن قبل از شکست حلقه می دانند (۱۲).
- منابع**
۱. رضاییان جهرمی، س. (۱۳۸۳). بررسی آلودگی شیمیایی دریاچه مهارلو. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم. صفحات ۳۰-۲۴.
  2. Andelman JB and Suess, MJ. 1970. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. *Bull World Health Organ.* 43(3): 479-508.
  3. Laflamme RE and Hites RA. 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 42(3): 289-303.
  4. Lake JL, Norwood C, Dimock C and Robert B, R. 1979. Origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 43(11): 1847-1854
  5. Koneman EW. 2006. *Koneman's Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology.* Lippincott Williams and wilkins.

**Isolation and characterization Anthracene degrading  
Gram negative bacteria from water and sediment  
contaminated by these compounds**

**Farshid Kafilzade<sup>1</sup>**

[Kafilzadeh@jia.ac.ir](mailto:Kafilzadeh@jia.ac.ir)

**Somaye behzadi shahrbabak<sup>2</sup>**

**Abstract:**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a group of compound composed of two or more fused aromatic rings that are carcinogen and mutagenic for human and animals. They are formed by the incomplete combustion of organic matter and fossil fuel.

PAHs are released into the environment from waste water of factories producing Coke, oil, refineries and industrials that use from very high temperatures, also these compounds are primary substance producing cosmetics, polymers, high explosive, fertilizer, colours and etc, that transfer to environment when used.

Today biodegradation of PAHs by microorganisms is the best way for fending these contamination and because bacteria have variety enzymes, hence they are the best microorganism. Anthracene is tricyclic aromatic hydrocarbon, solid and Phenanthrene isomer.

Anthracene is major source colours such Anthraquinone and Alizarin. Anthracene is formed by the incomplete combustion of fossil fuels.

In this paper, we isolate anthracene degrading Gram negative bacteria from Maharlu lake. Samples of lake, sediments and water were collected from four sites in Maharlu lake. Samples filtered and cultured in Mineral medium that include inorganic compound, trace element and anthracene.

Post of sequential cultures in specialized medium and employed biochemical tests, isolated gram negative bacteria and identified species and genus. The bacteria include *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Nocardia*, *Aeromonas*, *Mycobacterium* isolated and characterized as anthracene degrading bacteria from lake. Among these bacteria the most bacteria was in Khoshk river, estuary and the least was in lake, center. Whereas *Pseudomonas* have the most dispersal, can be used as anthracene degrading indicator species.

**Keywords:** Anthracene-*Pseudomonas*-Gram negative bacteria-biodegradation-polycyclic aromatic hydrocarbo

---

1- University of Azad, Jahrom

2- MD.Microbiology-university of Jahrom



