فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۵

مقاله تحقیقی

شناسایی مولکولی و تحلیل مکانی گونه های استنوتروفوموناس جدا شده از خاک‌های دشت مرودشت و ارزیابی اثر آن بر تجزیه برخی ترکیبات آروماتیک

زهره همتی[۱]، نیما بهادر[۲]*، هادی عبدالعظیمی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران:
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳. گروه علوم خاک، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

***نویسنده مسئول:** آدرس الکترونیکی: bahador@iaushiraz.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی شیراز

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵

چکیده

ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای در ردیف آلوده کننده های زیستی قرار می گیرند. بنابراین تحقیق حاضر بدنبال جداسازی استنوتروفوموناس و عملکرد آن بر برخی از این ترکیبات می باشد. ۷۵ نمونه خاک از دو زمین کشاورزی جمع آوری وپس از تهیه رقت متوالی از نمونه ها و کشت بر روی محیط نوترینت آگار گرمخانه گذاری گردید. کلنی های مشکوک به کمک تست های بیوشیمیایی تشخیص داده شد و در حضور ترکیبات مختلف آروماتیک تجزیه ترکیبات مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای دما و هوادهی بر روی تجزیه ترکیبات توسط جدایه ها مورد ارزیابی قرار گرفت و ایزوله های موثر توسط تکنیک مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. علاوه بر این تحلیل مکانی در رابطه با ارگانیسم مورد نظر در زمین های مورد آزمون ارزیابی گردید و آنالیز آماری بر روی داده ها انجام شد. در مجموع ۵ جدایه استنوتروفوموناس مالتوفیلیا شناسایی گردید. جدایه ها توانایی تجزیه تمامی ترکیبات شامل آنتراسن، اسنافتن، تولوئن بجز پیرول را دارا بودند. بهترین دما و میزان هوادهی به ترتیب ۴۰ و ۱۴۰ rpm در نظر گرفته شد. آنالیز آماری عدم وجود اختلاف معنی دار را برای تجزیه ترکیبات نشان داد و تمامی جدایه ها با درصد متفاوتی از تشابه همولوژیک استنوتروفوموناس مالتوفیلا استرین K279a به حساب می آیند. تحلیل مکانی روند تغییرات مکانی داده های زمین کشاورزی اول بیانگر آن است که زمین اول دارای باکتری استنوتروفوموناس با میزان فراوانی ۵/۷ ٪ درصد و زمین دوم ۷/۵ ٪ می باشد. بر اساس مشاهدات بدست آمده می توان از باکتری استنوترفوموناس مالتوفیلیا در پالایش زیستی استفاده نمود.

واژه های کلیدی : استنوتروفوموناس مالتوفیلیا، ترکیبات آروماتیک، واکنش زنجیره ای پلی مراز

مقدمه

ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای PAHsl ترکیبات شیمیایی حاوی دو یا چند حلقه ی بنزن ادغامی در آرایشات خوشه ای، گوشه دار یا خطی می باشند که حاوی کربن و هیدروکربن ها هستند. کربن های اروماتیک پلی سیکلیک (PACs) شامل هیدروکربن های غیرتعویضی و هیدروکربن های آروماتیک پلی سیکلیک تعویضی مانند PAH,intro- PAH می باشند که معمولا تحت شرایط احتراقی ناکارآمد مانند نبود اکسیژن کافی تولید می شوند (۱). اکثر این ترکیبات توسط فرایند تجزیه گرمایی و پایروسنتز مولکول های ارگانیک شکل می گیرند. PAHs از طریق مسیر های

مختلف وارد طبیعت می شوند و معمولا به عنوان مخلوطی حاوی ۲ و یا چند ترکیب یافت می‌شوند. این ترکیبات به طور وسیعی در اتمسفر بوده و یکی از اولین آلاینده های اتمسفر به عنوان کارسینوژن مشکوک معرفی می شوند، بطوریکه همچنان که وزن مولکولی آنها افزایش می یابد، کارسینوژنسیتی آنها نیز افزایش می یابد (۲).

روش های مختلفی برای تجزیه زیستی PAHs وجود دارد و هر روش دارای عملکرد مخصوص به خود و شرایط مطلوب می باشد. تجدید زیستی، استفاده از فرایند های زیستی به منظور تجزیه، قطعه قطعه کردن و تغییر شکل و یا رفع آلودگی ها از خاک یا آب می باشد (۳). تجزیه زیستی فرآیندی است که به کمک باکتریها، قارچ و گیاهان صورت می گیرد و به نوع ماده آلوده کننده وابسته می باشد (۴). در این راستا با استفاده از میکروارگانیسم ها، تجزیه ی آلاینده ها باعث کاهش خطرهای انسانی و محیطی می شود (۵). بنابراین به دلیل امنیت و سهولت دسترسی به این گروه از ارگانیسمها، تلاش برای جداسازی آنها به عنوان یک راه حل پذیرفته شده برای تمیز کردن آب و خاک آلوده در نظر گرفته می شود (۶).

استنوتروفوموناس مالتوفیلیا باسیل گرم منفی است که زیستگاه بسیار متنوعی داشته و از منابع آبی از جمله رودخانه‌ها، چاه‌ها، دریاچه‌ها و فاضلاب‌ها قابل جداسازی می‌باشد. در مطالعات صورت گرفته توسط محققین مشخص شده است که استنوترفوموناس در شرایط کومتبولیک قادر به تجزیه نیتروفنول در طول ۱۴ روز می-باشد. علاوه بر این در مطالعه مشابه دیگری که توسط منگونی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز گزارش گردید استنوترفوموناس به صورت موثرتری قادر به تجزیه هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک می‌باشند (۷). بنابراین تحقیق حاضر بدنبال جداسازی ارگانیسم مذکور از منابع خاکی و مطالعه اثر آن بر ترکیبات شیمیایی مختلف به عنوان یک پالایشگر زیستی می باشد (۸).

مواد و روش ها

موقعیت محدوده مورد مطالعه

جمع آوری نمونه ها از دو مزرعه اطراف شهرستان مرودشت استان فارس به صورت شبکه ای منظم طی شهریور ۹۴ انجام گردید. نمونه ها از مزرعه اول با فواصل ۱۰ متری به تعداد ۳۵ و در مزرعه دوم ۴۰ نمونه با فواصل ۱۷ متر از عمق ۵ سانتی متری جمع آوری گردید و موقعیت جغرافیایی مکان‌های نمونه گیری شده در هر دو مزرعه مشخص شد (شکل ۱). نمونه های جمع آوری شده در جعبه یخ نگه داری شده و جهت جداسازی ارگانیسم ها و شناسایی اولیه به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل گردید.

شکل ۱ - نقاط نمونه برداری شده در مزرعه کشاورزی اول و دوم.

تعیین بافت خاک

جهت تعیین بافت خاک میزان یک کیلوگرم خاک از مزارع جمع آوری گردید و در کیسه های پلی اتیلنی به آزمایشگاه شرکت زاگرس آبشناس فارس جهت آنالیز بافت خاک و سایر فاکتورهای ماکرو ومیکرو ارسال گردید و نتایج ثبت شد.

جداسازی و خالص سازی میکروارگانیسم

ابتدا نمونه های خاک جمع آوری شده خشک گردید تا رطوبت خاک گرفته شود و سپس نمونه ها الک (بدلیل اینکه سایز دانه های خاک یکسان باشد) شد. از ۷۵ نمونه خاک رقت متوالی (10^{-0} تا 10^{-4}) تهیه گردید و رقتهای نهایی بروی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس پلیتها در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. پس از اتمام این زمان کلیه پلیت ها مورد ارزیابی قرار گرفت و کلنی های ظاهر شده بروی پلیت ها بر اساس شکل کلنی باکتریایی و ویژگی های آن مقایسه گردید، از آنجایی که کلنی های استنوتروفوموناس به صورت صاف، براق و حاشیه هائی یکپارچه به رنگ سفید تا زرد کمرنگ مشاهده می شوند پس از انتخاب، نمونه ها بر روی محیط تریپتیکیاز سوی آگار (TSA)کشت داده شد و خالص سازی گردید (۷).

شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه ها

جهت شناسایی استنوتروفوموناس از تست های مختلف شامل: تستهای کاتالاز، تست اکسیداز، تست متیل رد، تست ووژپروسکوئر، تست سولفید- ایندول-موتیلیتی(SIM)، تست اوره آز، تست ذوب ژلاتین، تست بایل اسکولین، تست لیزین دکربوکسیلاز، تست اورنیتین دکربوکسیلاز، تست آمیلاز و تست ارزیابی استفاده از قندها شامل: گلوکز، آرابینوز و سوربیتول استفاده گردید(۹).

مواد شیمیایی مورد ارزیابی

مواد شیمیایی بکار رفته در تحقیق حاضر شامل: آنتراسن، اسنافتن، تولوئن و پیرول می باشد که تمامی ترکیبات تهیه شده به ترتیب ساخت شرکت سیگماکشور آمریکا، مرک آلمان و آلدریچ آمریکا می باشد.

تعیین منحنی رشد در حضور ترکیبات مختلف آروماتیک

جهت تعیین منحنی رشد باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا در حضور ترکیبات مختلف آروماتیک ابتدا محیط M9 با غلظت 5X طبق دستورالعمل تهیه گردید و محلول یک مولار از آنتراسن MW:۲۱/۱۵۴،اسنافتن MW:۲۴/۱۷۸، تولوئن MW: ۱۴/۹۲و پیرول MW: ۰۷/۶۷ تهیه گردید.

سپس سوسپانسیون باکتری در محیط تریپتیکیز سوی براث (TSB) کشت داده شده با غلظت نیم مک فارلند به محیط M9 حاوی ترکیبات آروماتیک اضافه گردید و جذب نوری جدایه ها در طول موج ۶۲۰ در زمان صفر (بلافاصله پس از تلقیح باکتری) ثبت شد. دستگاه با شاهد صفر گردید و در بازه زمانی ۴۸، ۳۶، ۲۴، ۱۲ ،۰ ساعت، هر ۱۲ ساعت میزان جذب نوری محیط کشت حاوی ارگانیسم و ترکیبت مورد نظر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

تعیین شرایط بهینه جهت پالایش زیستی

اثر دما

جهت تعیین منحنی رشد باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا در حضور ترکیبات مختلف آروماتیک، پس از تهیه محیط M9و افزودن محلول یک مولار از هر ترکیب و ارگانیسمهای جداسازی شده جذب نوری جدایه ها در طول موج ۶۲۰ در هریک از دماهای ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸ساعت هر ۱۲ ساعت اندازه گیری گردیدو نتایج ثبت شد.

اثر هوادهی

جهت تعیین منحنی رشد باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا در حضور ترکیبات مختلف آروماتیک پس از افزودن جدایه ها به محیط M9و هریک از ترکیبات آروماتیک جذب نوری هریک از جدایه ها در طول موج ۶۲۰ با میزان هوادهی ۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت ،هر ۱۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.

تحلیل مکانی

بر اساس تصویر ماهواره ای استخراج شده از گوگل ارت و با توجه به این که طول و عرض جغرافیایی مکان ها با دستگاه موقعیت یاب ثبت گردیدناحیه دقیق ارگانیسمهای جداسازی شده تعیین گردید.

شناسایی مولکولی جدایه ها

جهت شناسایی جدایه ها از آزمون زنجیره ای پلی مراز استفاده گردید.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کیت یکتا تجهیز استفاده گردید. سپس بر اساس آن ۱ ml از باکتری کشت داده شده در محیط کشت مایع، به درون لوله‌های سانتریفیوژ منتقل گردید و با بیشینه سرعت جهت جداسازی باکتری از محیط کشت سانتریفیوژ گردید. محلول موجود بر روی رسوب ایجاد شده در لوله‌های سانتریفیوژ خارج شده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول TG1 buffer به رسوب حاصل اضافه گردیده شد و به خوبی توسط پیپت با یکدیگر ادغام گردید. به محلول حاصل ۲۰ میکرولیتر محلول پروتئیناز K (10mg/ml) اضافه گردید و با کمک ورتکس به خوبی با یکدیگر ادغام گردید. محلول حاصل در دمای ۶۰C° تا لیز شدن کامل رسوب گرما گذاری گردید. جهت جمع آوری قطرات شکل گرفته در سر تیوب‌ها آن‌ها به آرامی اسپین گردیدند. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از محلول TG2 buffer به محلول اضافه گردیده شد و با کمک ورتکس خوب با همدیگر ادغام گردیده شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰C° گرما گذاری گردیدند. جهت جمع آوری قطرات شکل گرفته در سر تیوب‌ها آن‌ها را به آرامی اسپین گردیدند و ۲۰۰ میکرولیتر اتانل مطلق (۱۰۰٪-۹۶) به نمونه‌ها اضافه گردیده شد و با کمک ورتکس به خوبی ادغام گردیدند. جهت جمع آوری قطرات شکل گرفته در سر تیوب‌ها آن‌ها به آرامی اسپین شدند. برای هر نمونه یک عدد TG Mini Column در لوله‌های Collection Tube قرار داده شد و سپس محلول حاصل از مراحل قبل به این لوله انتقال داده شد و به مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانترفیوژ گردید. پس از اتمام سانترفیوژ TG Mini Columnها به Collection Tubeهای جدید منتقل گردیدند. TG Mini Columnها توسط سانترفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰rpm به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محلول W1 buffer شستشو گردیدند. محلول عبور کرده از فیلتر TG Mini Columnها دور ریخته شدند. TG Mini Columnها توسط سانترفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰rpm به همراه ۷۵۰ میکرولیتر محلول wash buffer شست شوی گردیدند. محلول عبور کرده از فیلتر TG Mini Columnها دور ریخته شدند. به منظور خشک شدن کامل لوله‌ها تمام نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰rpm سانترفیوژ گردیدند. TG Mini Columnها به درون Elution Tube قرار داده شدند. ۵۰-۲۰۰ میکرولیتر محلول Elution Buffer به در مرکز TG Mini Columnها افزوده شد و به مدت ۳ دقیقه TG Mini Columnها به صورت عمودی نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰rpm سانترفیوژ گردیدند. محلول حاصل از سانترفیوژ حاوی DNA می‌باشد. DNA استخراج شده در محلول حاصل در دمای ۲۰C°- نگهداری گردیده شد. در این مطالعه از یک جفت پرایمر اختصاصی جهت انجام واکنش PCR استفاده شده است که در جدول ۱ آمده است (۱۰).

جدول ۱. توالی پرایمرهای یونیورسال استفاده شده در واکنش PCR

Primers	Sequence 5'→3′
Forward	GCTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC
Reverse	ACGCAGTCACTCCTTGCG

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

از آنجایی که هر واکنش PCR در عمل تکرار چرخشی سه مرحله‌ی واسرشت سازی، اتصال و طویل سازی صورت می پذیرد جهت انجام این آزمون حجم مواد مورد نیاز در جدول ۲ آورده شده است. برای هر نمونه نیاز به یک مخلوط PCR است که شامل پرایمرهای اختصاصی مورد مطالعه می‌باشند. به درون یک میکروتیوپ۱/۵ اجزاء واکنش PCR را اضافه کرده (به غیر از DNA)، سپس آن را جهت یکنواخت شدن پیپتینگ کرده و این مخلوط به صورت مساوی بین میکروتیوپ‌های مخصوصPCR اضافه گردید. سپس DNA هر نمونه به میکروتیوپ‌های محتوی اجزاء PCR اضافه گردید و در نهایت میکروتیوپ‌ها را Spin شده و در دستگاهترموسایکلر قرار داده شد و برنامه زمانی جهت تکثیر ژن‌های مورد بررسیدر جدول ۳ آورده شده است. بعد از انجام واکنش PCR جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها محصولات حاصل از واکنش بر روی ژل ۲٪ منتقل شده و به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند.

به منظور انجام الکتروفورز بر روی نمونه‌های مورد مطالعه ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE تهیه شد. سپس هر نمونه از محلول PCR درون چاهک‌ها ریخته شد. در اولین

چاهک از DNA ladder مناسب استفاده گردید و تانک به منبع تغذیه طوری متصل شد که چاهک‌ها به سمت قطب منفی قرار گیرند و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت نمونه‌ها الکتروفورز شدند.

جدول ۲. حجم مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR

ماده	حجم مورد نیاز (میکرولیتر)
D.W	۲
Super DNA master mix (PCR buffer, $Mgcl_2$,dNTP)	۲۰
Primer forward	۱
Primer reverse	۱
DNA	۱
حجم نهایی	۲۵

جدول ۳. برنامه زمانی PCR

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
Primary denaturation	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴°C	۴۵ ثانیه	۳۰
Annealing	۶۸°C	۴۵ ثانیه	
Extension	۷۲°C	۳۰ ثانیه	
Final extension	۷۲°C	۶ دقیقه	۱

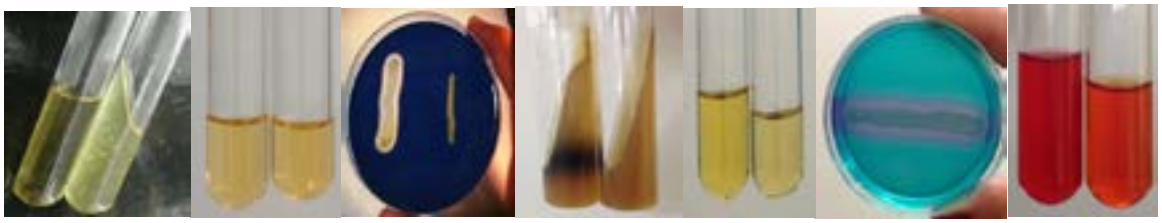
آنالیز آماری داده ها

فرضیه برابری میانگین زمان های مختلف با آزمون ناپارامتری ANOVA بررسی گردید. این فرضیه به تفکیک دما و هوادهی ، در سطح ۹۵٪ با $p\leq0.05$ بصورت جداگانه ارزیابی گردید و نتایج ثبت شد.

نتایج

جمع آوری نمونه ها و شناسایی فنوتیپی

به طور کلی از ۳۰۰ نمونه رشد یافته ۱۰۵ کلنی باکتریایی که از نظر مرفولوژی به استنوتروفوموناس شباهت داشتند انتخاب گردید و از بین آنها از زمین شماره یک، ۲ جدایه از نقاط شماره ۲ و ۶ و از زمین شماره دو، ۳ جدایه باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا از نقاط شماره ۹، ۱۴، ۲۷ جداسازی گردید. همچنین جدول ۴ و تصاویر حاصل از تستهای بیوشیمیایی در تایید ایزوله ها می باشد (شکل ۲).



شکل ۲ - تست های بیوشیمیایی انجام شده جهت شناسایی استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بترتیب از راست به چپ گلوگز، تست DNase، متیل رد، بایل اسکولین، آمیلاز، اوره، هیدرولیز ژلاتین

جدول ۴ – تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی جدایه ها.

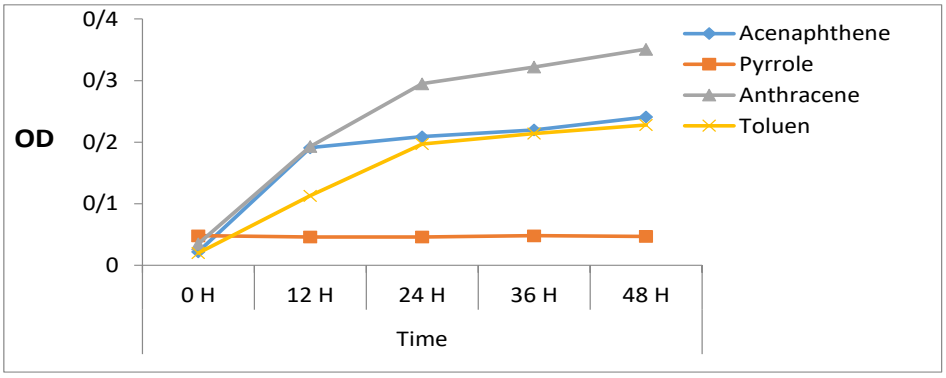
No. isolates	1	2	3	4	5
Gram	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
motility	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
OD	-	-	-	-	-
LD	+	+	+	+	+
MR	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
DNase	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-

بافت خاک

نتایج حاصل از بافت خاک زمینهای کشاورزی اول و دوم بیانگر آن است که با توجه به درصد میزان شن، رس و لای تعیین شده بافت خاک در گروه خاک های شنی، رسی آهکی قرار می گیرد (۱۱). همچنین اسیدیته خاک نیز به برای هر دو گروه زمین در محدوده ی ۷ می باشد که این امر به عنوان فاکتوری مناسب برای رشد باکتری به شمار می آید. زیرا به علت وجود شن و رس از طرفی هوادهی مناسب در خاک انجام می شود و از طرف دیگر حضور رس سبب می شود که عناصر مغذی در خاک تبادل شده و به رشد ارگانیسم ها کمک نماید

منحنی رشد در حضور ترکیبات

با توجه به نتایج به دست آمده از نمودار ۱ معلوم گردید دمای ۳۷ درجه سیلسیوس بهترین دما جهت رشد باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا در حضور ترکیبات آنتراسن، اسنافتن، تولوئن به استثنا پیرول می باشد. نتایج حاصل از نمودار بیانگر آن است که باکتری در حضور آنتراسن بیشترین و تولوئن کمترین رشد را دارا بوده است و این در حالیست که ارگانیسم در مجاورت پیرول رشد نداشته است.



نمودار ۱ - رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف دمای۳۷ درجه سیلسیوس.

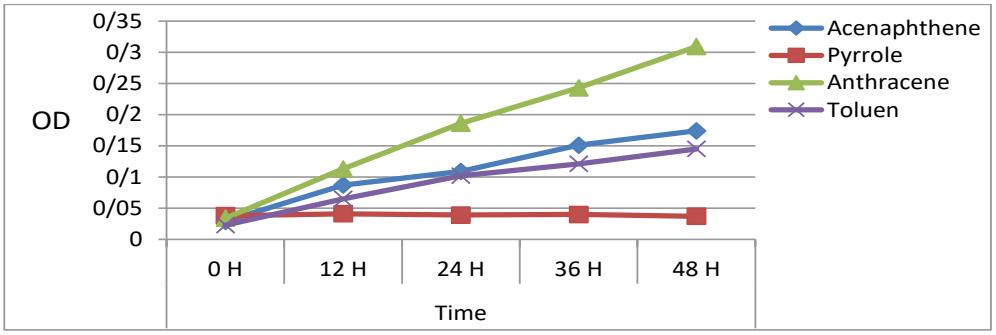
تعیین شرایط بهینه

اثر دما

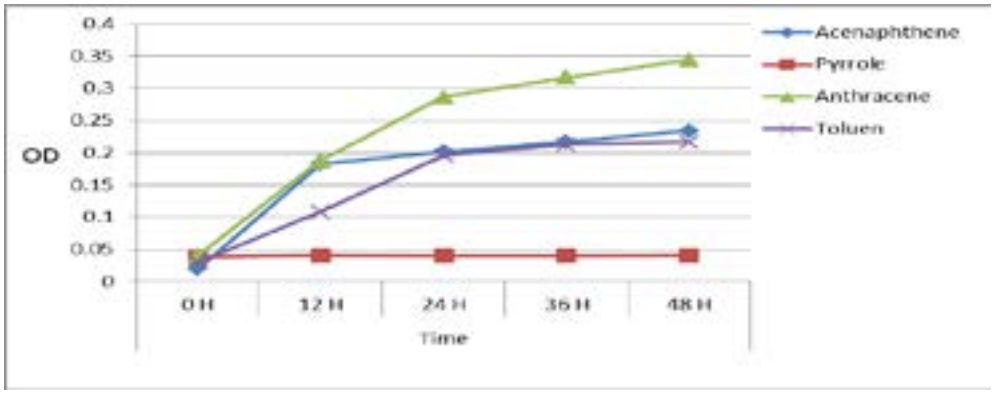
با توجه به نتایج به دست آمده از نمودارهای ۲ تا ۵ معلوم گردید که ارگانیسم توانایی رشد در دماهای متفاوت ۴۵

۴۰، ۳۵، ۳۰، در حضور ترکیبات مختلف به استثنا پیرول را دارا می باشد. همچنین نتایج بیانگر آن است

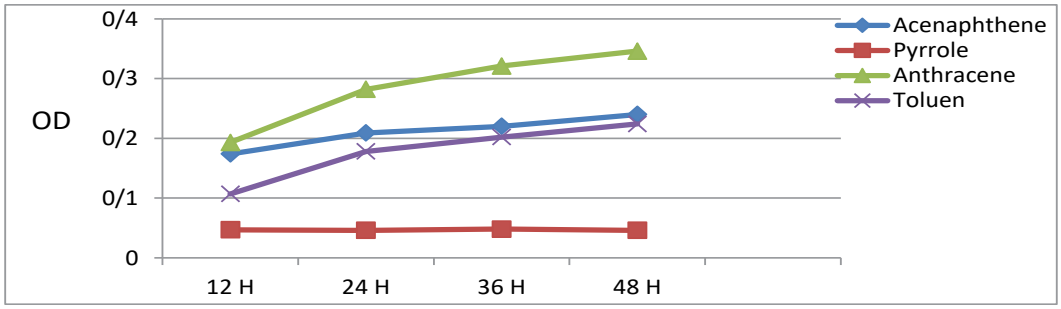
باکتری در حضور آنتراسن بیشترین و تولوئن کمترین رشد را دارا بوده است و بهترین دما جهت رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف ۴۰ درجه سیلسیوس می باشد و این در حالیست که رشد در دمای ۴۰ درجه سیلسیوس به مراتب مناسبتر از دمای ۳۷ درجه می باشد.



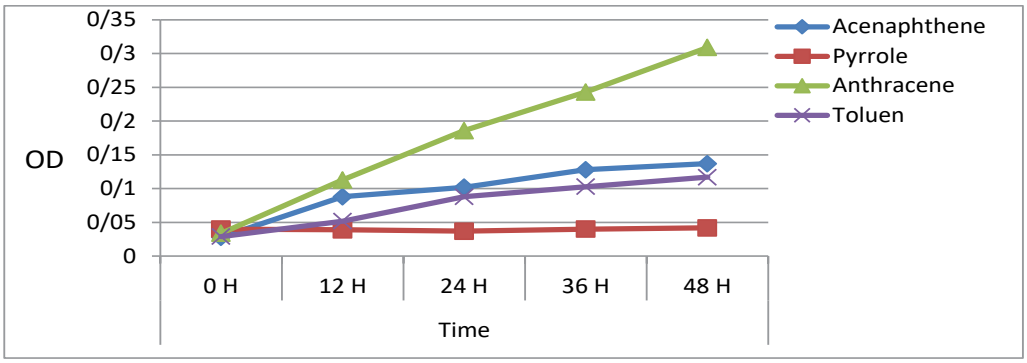
نمودار ۲ - رشد ارگانیسم درحضورترکیبات مختلف دردمای ۳۰ درجه سیلسیوس.



نمودار ۳ - رشدارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف در دمای ۳۵ درجه.



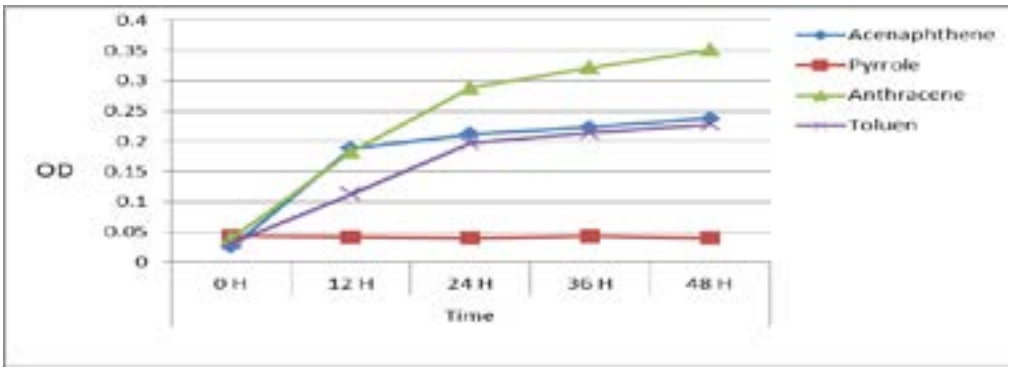
نمودار ۴ - رشدارگانیسم درحضورترکیبات مختلف در دمای ۴۰ درجه.



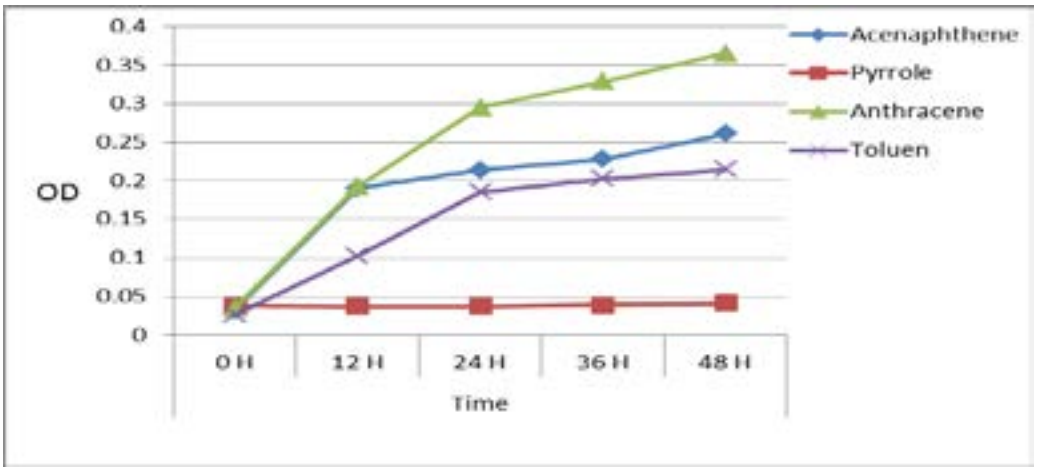
نمودار ۵ - رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف در دمای ۴۵ درجه.

اثر هوادهی

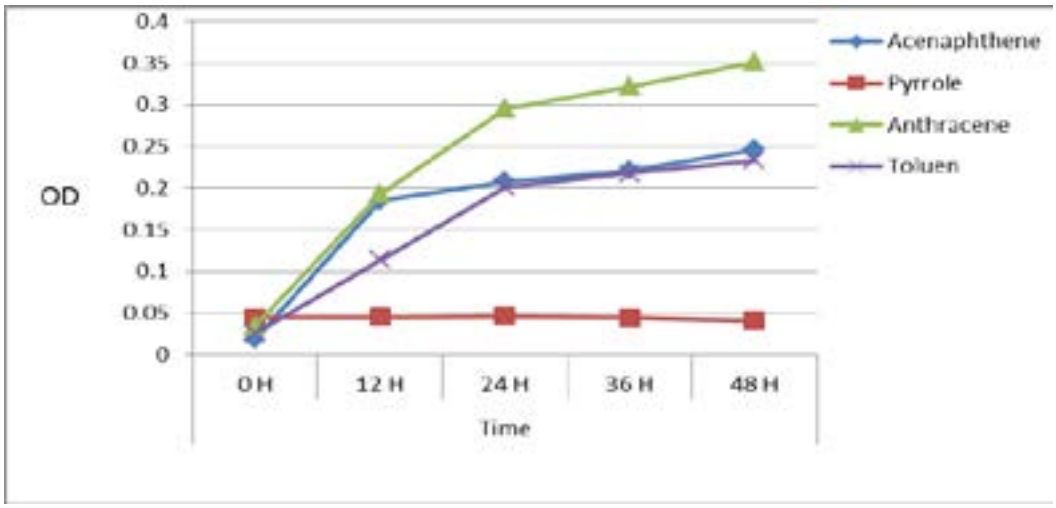
با توجه به نتایج به دست آمده از نمودارهای۶ تا ۸ معلوم گردید که ارگانیسم توانایی رشد در rpmهای متفاوت ۱۶۰، ۱۴۰، ۱۲۰در حضور ترکیبات مختلف به استثنا پیرول دارا می باشد نتایج بیانگر آن است باکتری در حضور آنتراسن بیشترین و تولوئن کمترین رشد را دارا بوده است و بهترین میزان هوادهی در حضور ترکیبات مختلف ۱۴۰rpm می باشد.



نمودار ۶ - رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف در ۱۲۰ rpm



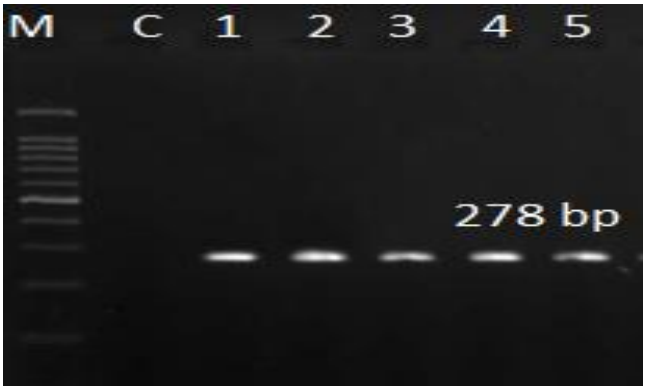
نمودار ۷ - رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف در ۱۴۰ rpm



نمودار ۸ - رشد ارگانیسم در حضور ترکیبات مختلف در ۱۶۰ rpm

شناسایی مولکولی

با توجه به آزمون های بیوشیمیایی اولیه و تشخیص ارگانیسم به عنوان استنوتروفوموناس آزمون مولکولی تائیدی بر این گواه بوده است. به طوری که در شکل ۳ تشخیص نهایی بر اساس باند بدست آمده بر روی ژل و سایت NCBI داده شده است. ارگانیسم های جداسازی شده همگی استنوتروفوموناس مالتوفیلا استرین K279a به حساب می آیند که برای اولین جدایه با ۱۰۰٪ شباهت و در موارد بعدی برای جدایه های دوم، سوم و پنجم به ترتیب ۹۹٪ و ۹۸٪ و جدایه چهارم با ۸۸٪ شباهت شناسایی شده است که جدایه چهارم می تواند به عنوان سویه ایی جدید در منطقه به حساب آید (شکل ۳).

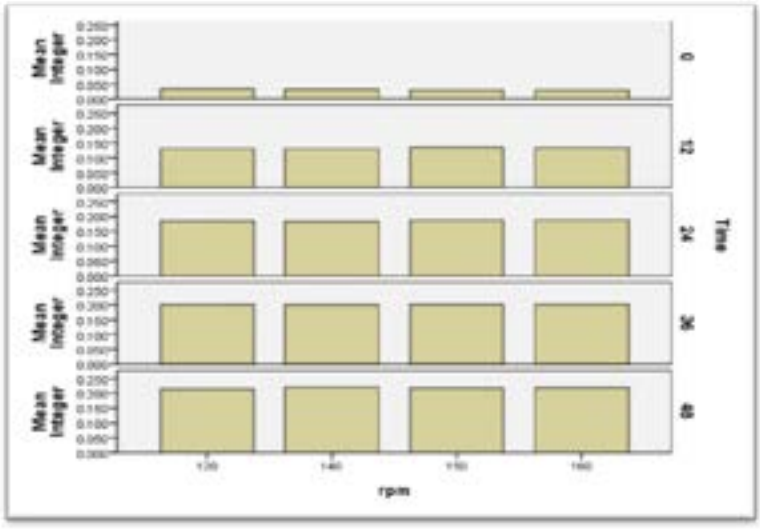


شکل ۳. تصویر الکتروفورز حاصل ازآزمونPCR. Lane1. مارکر (۱۰۰bp)، Lane2 نمونه کنترل منفی، Lane3-7 ایزوله های شناسایی شده(۲۷۸bp).

آنالیز آماری

فرضیه برابری میانگین rpm های مختلف با آزمون ناپارامتری ANOVA بررسی گردید. این فرضیه به تفکیک زمان یعنی در زمان صفر و ۱۲ و۲۴ و ۳۶و ۴۸ بصورت جداگانه ارزیابی شد. همانطور که در نمودار ۹ مشاهده می شود و با توجه به P-value بدست آمده تمام آزمون ها بیشتر از ۰/۰۵ بوده، که حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در تمام زمان ها بین میانگین در rpm های مختلف می

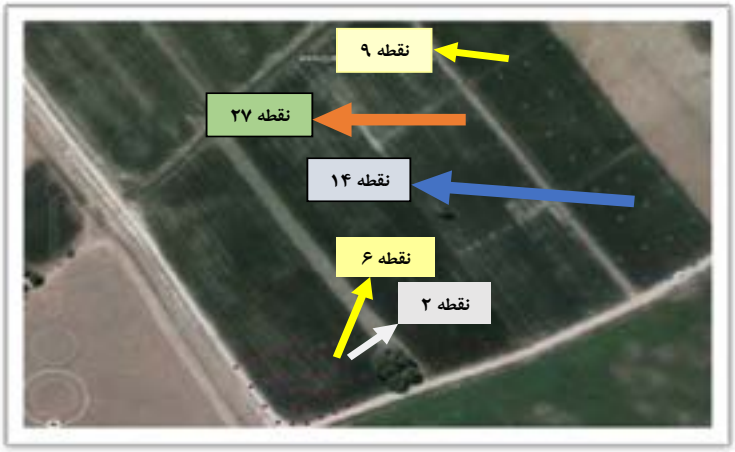
باشد. همچنین فرضیه برابری میانگین دماهای مختلف با آزمون ناپارامتری ANOVAبررسی گردید. دراین فرضیه به تفکیک دما یعنی در دمای ۳۰و ۳۵و ۴۰ و۴۵ بصورت جداگانه رشد ارگانیسم بررسی شد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود P-value تمام آزمون ها بیشتر از ۰/۰۵ بوده، که حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در تمام دماها بین میانگین در زمان های های مختلف می باشد.



نمودار ۹ – آنالیزآماری داده ها براساس رشد درشرایط هوادهی متفاوت.

تحلیل مکانی

روند تغییرات مکانی داده های زمین کشاورزی اول نشان می دهد که نقاط شماره ۶ و ۲ دارای باکتری استنوتروفوموناس بوده (شکل ۴) و درصد فراوانی باکتری زمین کشاورزی اول ۵/۷٪ و برای زمین کشاورزی دوم نقاط شماره ۹ و ۱۴ و ۲۷ دارای باکتری استنوتروفوموناس بوده (شکل ۴) که درصد فراوانی باکتری زمین کشاورزی دوم ۷/۵ ٪ گزارش گردید و مجموع درصد فراوانی باکتری هر دو زمین ۱۳/۲٪ می باشد.



شکل ۴ – نمایش تغییرات مکانی داده های زمین کشاورزی اول.

بحث

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای پراکنش وسیعی در محیط زیست دارند و به عنوان یکی از عوامل سرطان زا و جهش زای موجودات مطرح می‌باشند. از میان تمام روش‌های حذف آلودگی، زیست پالایی به کمک فرآیندهای میکروبی با کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان قادر به تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیر سمی می‌باشند (۱۲).

در مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌ها، با استفاده از روش‌های مرسوم از عمق مناسب خاک شهرستان مرودشت واقع در استان فارس نمونه برداری صورت گرفت. پس از نمونه برداری به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های موجود در نمونه‌های جمع آوری شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و سپس با کمک نتایج حاصل از رنگ آمیزی گرم و مشخصات مورفولوژیکی حاصل کشت اولیه غربالگری‌های اولیه صورت گرفت. همچنین جهت شناسایی این جدایه‌ها از تست‌های بیوشیمیایی استفاده شد. نتایج حاصل از این تست‌ها حاکی از وجود باکتری‌هایی با ویژگی‌های کاتالاز LD، H_2S، DNase، اسکولین، موتیلیتی، VP، آمیلاز و ژلاتین مثبت می‌باشد، که حاکی از وجود استنوترفوموناس مالتوفیلیا در جدایه‌های حاصل از نمونه‌های جمع آوری شده می‌باشد. مشاهدات حاصل از این مطالعه در تطابق با مشاهدات وجسیزین اسکا در سال ۲۰۱۰می‌باشد (۱۳). در مطالعه صورت گرفته توسط وی مشخص شد که استنوترفوموناس در شرایط کومتابولیک قادر به تجزیه ۰/۴ تا ۰/۲۵ میلی مولار نیتروفنول در طول ۱۴ روز می‌باشد. در مطالعه مشابه دیگری که توسط منگوانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز گزارش گردید استنوترفوموناس به صورت موثرتری قادر به تجزیه هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک می‌باشند (۷).

از طرف دیگر در مطالعه ایی که توسط نوریه و همکاران در سال ۱۳۸۸ انجام گردید، میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن های حلقوی جداسازی و پس از سازگاری و غنی سازی، باکتری‌ها شناسایی شدند. یافته ها نشان داد که گونه های سودوموناس، باسیلوس، سودوموناس آئروژینوزا، استینوباکتر، به طور همزمان در حذف فنانترن نقش دارند (۱۴).

بر اساس نمونه برداری صورت گرفته از خاک شهرستان مرودشت و آنالیزهای صورت گرفته بر روی آن مشخص شد که خاک منطقه حاوی ٪۳۰/۳۲ رس، ٪۳۲/۸۰ شن، ٪۳۶/۸۸ لای می‌باشد که بر اساس طبقه بندی صورت گرفته این خاک دارای بافت رسی شنی آهکی می باشد که به علت وجود شن و رس از طرفی هوادهی مناسب در خاک انجام می شود و از طرف دیگر حضور رس سبب می شود که عناصر مغذی در خاک تبادل شده و به رشد ارگانیسم ها کمک نماید (۹). در همین راستا محققین در سال ۲۰۰۰ بیان کردند که باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلا توانایی سم زدایی و تجزیه هیدروکربن‌های سنگین آروماتیک را در محیط پایه مایع دارا می‌باشند. آن‌ها گزارش کردند که طی ۲ تا ۴۲ روز این باکتری توانایی تجزیه و سم زدایی ٪۵۵ از هیدروکربن‌های آروماتیک همچون آنتراسن، پیرن، فلورانتن را دارا می‌باشند (۱۵).

پس از آن در سال ۲۰۰۲ لی و همکاران بیان کردند که جدایه‌های استنوتروفوموناس مالتوفیلا استرین T3-c قادر به رشد در محیط کشت حاوی تولوئن، بنزن و اتیلن بنزن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می‌باشند. آن‌ها تاثیر عوامل محیطی همچون حجم اولیه تولوئن، pH محیط و دمای گرما گزاری را بر روی میزان کار آمدی باکتری در هضم و تجزیه تولوئن بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که توانایی هضم و تجزیه تولوئن توسط این استرین در pH بین ۵ تا ۸ امکان پذیر می‌باشد. همچنین عنوان نمودند که میزان تجزیه تولوئن در دمای ۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ٪۴۳ و ٪۸۳ بیشتر می‌باشد و نرخ هضم اختصاصی تولوئن، بنزن و اتیلن بنزن توسط این باکتری به ترتیب ۲/۳۸ µmol/g-DCW/hr، ۴/۲۵ و ۲/۰۶ می باشد (۱۶). بدنبال آن سایر محققین در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ایی موفق به جداسازی ۱۱جنس از باکتریهای تجزیه کننده برخی هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک از مکان‌هایی شدند که به فرآورده های نفتی همچون گازوئیل آلوده شده بودند که از مهمترین باکتریهای جداشده در این مطالعه می‌توان به سودوموناس، آگروباکتریوم، باسیلوس و اسفنگوموناس اشاره نمود (۱۷).

بر اساس مشاهدات حاصل از این مطالعه باکتری استنوترفوموناس مالتوفیلیا در دماهای ۳۰ تا ۴۵ درجه سیلسیوس قادر به هضم و تجزیه هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک از جمله اسنافتن، آنتراسن و تولوئن به

عنوان تنها منبع کربن و انرژی می‌باشد. بر اساس مشاهدات صورت گرفته این باکتری در هیچ دمایی قادر به استفاده از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک پیرول به عنوان منبع کربن و انرژی نمی‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت حضور ترکیبات شیمیایی مختلف که انسان از طریق کارخانه ها و به صورت سینتتیک به محیط زیست وارد می نماید و می تواند خطر ساز باشد تحقیق حاضر ضمن جداسازی این میکروارگانیسم از خاک و توانایی تجزیه ترکیبات آروماتیک حلقوی عنوان می نماید که می‌توان از آن جهت پاکسازی منابع آبی و خاکی اطراف پالایشگاه‌ها و منابع نفتی از آن به عنوان یک پالایشگر زیستی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مسئولین سرکار خانم علائی عضو هیات علمی واحد کازرون که در بخش آماری این پروژه همکاریهای لازم را نمودند نهایت تشکر و قدردانی را می نماید.

منابع مورد استفاده

۱. اسکندری، س.، ودجی، م.، طهمورث پور، آ.، عبدالهی، آ. ۱۳۹۲. پتانسیل زیست درمانی باکتری های گرم مثبت بومی جداسازی شده از خاک آلوده به هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای. مجله دنیای میکروب ها، سال ششم، شماره اول، ص ۴۴-۳۴.

۲. نوریه، ن.، ناصری، س.، رضایی کلانتری، ر.، ندافی، ک.، محوی، ا. ح.، خزائی، م. ۱۳۸۸. جداسازی و بررسی پتانسیل بیولوژیکی باکتری های تجزیه کننده فنانترن. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دوره یازدهم، شماره ۳، ص ۶۲-۵۳.

3. Mangwani, N., Shukla, S., K., Kumari, S., Rao, T.,S, Das, S., 2014. Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. J Appl Microbiol 117(4): 1012-24.
4. Ryan, D., Robert, P., 2009. The versatility and adaption of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nature Reviews: Microbiology 7(7): 514-525.
5. Boonchan, S., Britz, M., Stanley G.A., 2000. Degradation and mineralization of high molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co cultures. Appl Environ Microbiol 66: 1007–1019.
6. Llado, S., Jimenez, N., Vinas, M., Solanas, A. M., 2009. Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged bio-stimulated creosote- contaminated soil. Biodegrad 20: 593–601.
7. Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. F., Hartel, P. G., Zuberer, D. A., 2005. Principles and applications of soil microbiology, New Jersey, Pearson Education Inc.
8. Sayara, T., Sarra, M., Sanchez, A., 2010. Optimization and enhancement of soil bioremediation by composting using the experimental design technique. Biodegrad 21: 345-356.
9. Metan, G., Hayran, M., Hascelik, G., Uzun, O., 2006. Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia. An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. Scand J Infect Dis 38: 527–531.
10. Falagas, M., Kastoris, K., Vouloumanou, I., Rafailidis, M., Kapaskelis, G., 2009. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. Future Microbiol 4(9):1103-1109.
11. Piyali, M., Pranab, R., 2012. Identification and characterization of a bacterial isolate capable of growth on trichloroethylene as the sole carbon source. Advances in Microbiology 2: 284-294.
12. Gallo, S. W., Ramos, P. L., Ferreira, C. A., Oliveira, S. D., 2013. A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 108(3): 390-391.
13. Sharma, P. D., 2005. Environmental microbiology. Alpha Science Int'l Ltd.
14. Wojcieszyńska, D., Guzik, U., Greń, I., Perkosz, M., Hupert-Kocurek, K., 2011. Induction of aromatic ring: cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27(4): 805-811.
15. Juhasz, A. L., Stanley, G. A., Britz, M. L., 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. Letters in Applied Microbiology 30(5): 396-401.
16. Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S., Ryu, H. W., 2002. Degradation characteristics of toluene,

benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. Journal of the Air & Waste Management Association 52(4): 400-406.

17. Lockhart, S. R., Abramson, M. A., Beekmann, S. E., Gallagher, G., Riedel, S., Diekema, D. J., Quinn, J. P., Doern, G. V., 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. Journal of Clinical Microbiology 45(10): 3352-3359.