محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۷۴۳ تا ۷۵۶

مطالعه توانایی باکتری های جداسازی شده از رسوبات خلیج فارس در حذف زیستی فلز سرب و هیدروکربن آنتراسن

فاطمه شاه علیان[۱] ،راضیه لموچی[۱۱*]، علیرضا صفاهیه[۲] ، نگین سلامات[۲]، فاطمه موجودی[۳]، هاجر آبیار[۴]، مصطفی زارع دوست[۵]

1. *دانش‌آموخته کارشناسی ارشد آلودگی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی*
2. *استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی*
3. *دانشجوی دکترای آلودگی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران*
4. *دانشجوی دکتری آلودگی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس*
5. *دانشجوی دکترای مدیریت محیط زیست، دانشکده محیط زیست و انرژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران*

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۱۲)

چکیده:

این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی گونه های *Ochrobactrum anthropi* و *Psedomonas putida* به عنوان شاخص برای سنجش جذب فلز سرب و تجزیه آنتراسن در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج نشان داد که گونه های مذکور در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن بخوبی رشد داشته اند. بگونه ای که حداکثر رشد در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب ۱/۳۹ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن ۰/۵۳۰ اندازه گیری گردید. نتایج حاصل از بررسی توانایی جذب فلز سرب توسط باکتری *O. anthropi* در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر و حذف آنتراسن توسط *P. putida* در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر حاکی از آن بود که باکتری های فوق از همان لحظه تلقیح به سرعت فلز و آنتراسن را از محلول جذب کرده و میزان آنرا بسرعت در محلول کاهش می دهند. حذف سرب و آنتراسن از محلول فلزی و هیدروکربنی توسط گونه های *Ochrobactrum anthropi* و *Psedomonas putida* دقایق انتهایی سنجش بطور فعالی ادامه داشت و در انتهای آزمایش به ترتیب ۸۴ درصد سرب و ۷۷/۹۸۶ درصد آنتراسن حذف گردید.

کلید واژگان: حذف زیستی، فلزات سنگین، آنتراسن، *P. putida*، *O.anthropi*

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۳۷۶۸۸۳۱۳ ایمیل: raziehlamoochi@yahoo.com

۱. مقدمه

قابلیت جذب و حذف آلاینده ها نظیر فلزات سنگین و هیدروکربن ها از محیط توسط میکروارگانیسم ها پژوهشگران را به سمت مطالعه توانایی انواع قارچ ها، جلبک ها، مخمرها و باکتری ها جهت پاکسازی این آلاینده ها از اکوسیستم های آبی سوق داده است. ورود فلزات سنگین به محیط به واسطه فعالیت های صنعتی و توسعه شهرنشینی به مراتب بیشتر از میزان ورود آنها از طبیعت به محیط است. اکثر فلزات سنگین کاتیون های فلزی هستند که بخاطر تشکیل ترکیبات پیچیده نقش اساسی در واکنش های بیوشیمیایی بدن را داشته و در غلظت های بالا برای بدن سمی هستند (Saeed and Iqbal, 2003). از جمله این عناصر میتوان به فلز سرب اشاره کرد که یک عنصر غیر ضروری برای موجودات زنده و انسان است و می تواند جایگزین کلسیم در استخوان شده و منجر به پوکی استخوان گردد (Pajohande and Howard, 2002; shariati, 1999). هیدروکربن آنتراسن با داشتن ۳ حلقه بنزنی با وزن مولکولی پایین در گروه ترکیبات PAH قرار دارد و موجب ایجاد موتاسیون و تاثیرات منفی بر روی انسان می گردد (Skupinska *et al.*, 2004; Wick *et al.*, 2011; Neeraja *et al.*, 2013). در تخریب زیست محیطی آلاینده ها، ارائه راه کارهای ارزان و ایمن برای برطرف کردن آن ها مطرح است. در این بین پاکسازی بیولوژیک آلودگی های نفتی و فلزی به وسیله میکروارگانیسم ها بسیار آسان است. زیرا میکروارگانیسم های حذف کننده آلاینده ها از محیط، در حالت طبیعی به طور گسترده در طبیعت (محیط های آبی و خشکی) توزیع شده اند (Juhasz *et al.*, 2000; Anisuddin *et al.*, 2005). دیواره سلولی باکتری ها متشکل از لایه پپتیدوگلیکان، پروتئین ها و ترکیبات پلی ساکاریدی است که به دلیل وجود گروههای دارای بار منفی (کربوکسیل، هیدروکسیل، سولفیدریل و فسفوریل) قادر به جذب کاتیون های فلزات سنگین می باشند (Gupta *et al.*, 2000; Mehta and Gaur, 2005). همچنین جهت شکسته شدن ترکیبات نفتی، باکتری با اضافه کردن گروه هیدروکسیل به حلقه های غیر اشباع آروماتیک واکنش هضمی هیدروکربن ها را انجام داده و باعث تولید دی اکسیدکربن، آب و فرآورده های سازگار با محیط زیست می شود (Shape and Rayner, 2005).

سایت مورد بررسی برای جمع آوری رسوب آلوده از سواحل شمال غرب خلیج فارس (بندر امام خمینی) انتخاب گردید. این بندر به دلیل وجود صنایع پتروشیمی و بارگیری نفت دارای پتانسیل افزایش فلزات سنگین و مواد نفتی از جمله سرب و آنتراسن می باشند. تحقیق حاضر بر آن است که در جهت حذف زیستی آلاینده هایی نظیر فلزات سنگین و هیدروکربن ها که از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند، از باکتری های بومی منطقه که قابلیت حذف این گونه آلاینده ها را دارند استفاده نماید و به این ترتیب گامی موثر در جهت ارائه یک روش کاربردی برای حذف چنین آلاینده هایی بردارد.

۲. مواد و روش ها

نمونه برداری با استفاده از ون وینگراب در عمق ۰-۳ سانتی متری سطح رسوب منطقه بندر امام خمینی با ۳ تکرار انجام شد. نمونه ها در درون شیشه های استریل بر روی تکه های یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت جداسازی باکتری مقاوم به فلز سرب، پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، یک گرم از رسوب نمونه برداری شده به ۱۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد اضافه و تا تهیه رقت $۱۰^{-۳}$ ادامه یافت (Dzairi *et al*., 2004). از هر رقت ۰/۱ میلی لیتر بر روی سطح محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز سرب کشت داده شد. سپس نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز در انکوباتور گرماگذاری شدند (Leung *et al*., 2000). با ظهور کلنی بر سطح نوترینت آگار، به منظور بدست آوردن کلنی خالص این مرحله از آزمایش ۲ تا ۳ بار تکرار گردید (Chovanova *et al*., 2004).

برای جداسازی میکرو ارگانیسم های احتمالی موجود در رسوبات آلوده به نفت جمع آوری شده، ۱ گرم از نمونه رسوب (رقت ۰/۱) را به ترکیبات محیط کشت نمکی حاوی ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن (۹۹٪) که در جدول ۱ آورده شده، اضافه گردید:

جدول ۱. ترکیبات محیط کشت در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر (pH:۷±۰/۵)

عناصر میکرو	$K_2HPO_4,3H_2O$	NH_4CL	$MgSO_4,7H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$	$FeSO_4.7H_2O$
۱۰۰ میکرولیتر	۲/۵ گرم	۵ گرم	۱ گرم	۰/۰۵ گرم	۰/۰۵ گرم

محیط ها به مدت یک هفته در یک شیکر انکوباتور با شدت هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. ۱۰ میلی لیتر از محتویات ارلن مایر های ذکر شده مجددا به ارلن مایر هایی با همان شرایط انتقال داده شد. بعد از ۳ مرحله کشت میکروارگانسیم ها در محیط پایه نمکی با استفاده از روش کشت خطی خالص سازی صورت گرفت (Kumar *et al*, 2006).

بررسی ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی باکتری و آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی میکروارگانیسم با کتاب راهنمای برجی انجام گرفت (Garrity *et al*., 2002).

۱,۲ مطالعه رشد باکتری مقاوم به فلز سرب

به منظور مطالعه میزان رشد باکتری مقاوم به فلز سرب ، یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت LB broth با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز سرب اضافه گردید. نمونه شاهد فاقد فلز (کنترل مثبت) نیز جهت مقایسه در نظر گرفته شد. نمونه ها در انکوباتور شیکردار در دمای

۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سنجش رشد باکتری بمدت ۵ روز و در فواصل زمانی ۱۲ ساعت با استفاه از در طول موج ۶۰۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گردید (Shirdam *et al.*, 2006).

۲,۲ مطالعه رشد باکتری مقاوم به آنتراسن

محیط های کشت مایع حاوی ۳ میلی لیتر سوسپاسیون باکتری جهت رشد باکتری ها با غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن آماده گردید. یک شاهد شامل تمام اجزا بدون باکتری تهیه گردید. زمان کل آزمایش مربوط به رشد ۱۲ روز تعیین شد و هر ۲۴ ساعت، نمونه گیری جهت سنجش میزان رشد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV: 600 nm) انجام گرفت (Nnamchi *et al.*, 2006).

۳,۲ بررسی توانایی حذف سرب توسط باکتری

یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول فلز سرب با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری تلقیح گردید. سپس ارلن ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سنجش میزان جذب فلز سرب توسط باکتری به مدت ۱۵۰ دقیقه و در هر ۳۰ دقیقه صورت پذیرفت. نمونه شاهد فاقد باکتری جهت مقایسه در نظر گرفته شد (Kim *et al.*, 2007; Azza *et al.*, 2009). سنجش نمونه ها با ۳ تکرار انجام پذیرفت. توانایی باکتری در حذف فلز سرب، با کسر میزان فلز باقیمانده در محلول از میزان اولیه فلز، تعیین گردید.

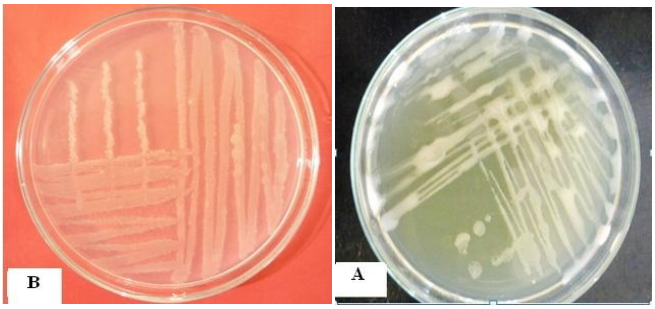
۴,۲ بررسی توانایی حذف آنتراسن توسط باکتری

میزان تجزیه آنتراسن را در محیط های معدنی اولیه ۱۰۰ میلی لیتری با افزودن ۳۰ میلی گرم هیدروکربن مذکور و ۵۰۰ میکرو لیتر سوسپاسیون باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با هوادهی ۱۵۰ دور پس از ۵ روز با دستگاه HPLC در فواصل زمانی ۲۴ ساعته اندازه گیری شد (Coral and Karagoz, 2005).

۳. نتایج

نتایج حاصل از شناسایی باکتری های جداسازی شده از نمونه های رسوب در جدول ۲ ارائه شده است.

رشد باکتری در فواصل زمانی ۱۲ ساعت به مدت ۵ روز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی گردید. سنجش رشد باکتری *O. anthropi* در نمونه فاقد سرب نشان می دهد که این باکتری سریعا وارد فاز لگاریتمی شده و بعد از ۷۲ ساعت به حداکثر رشد خود می رسد. میزان جذب نوری زمانی که باکتری به حداکثر رشد خود رسید، ۱/۵۱ بود. غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب باکتری نظیر نمونه شاهد رشد خود را بدون تاخیر آغاز کرده و بسرعت وارد فاز لگاریتمی شد. رشد اولیه باکتری در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب سریع بوده و بعد از طی ۷۲ ساعت به حداکثر رشد خود رسید (شکل۲).

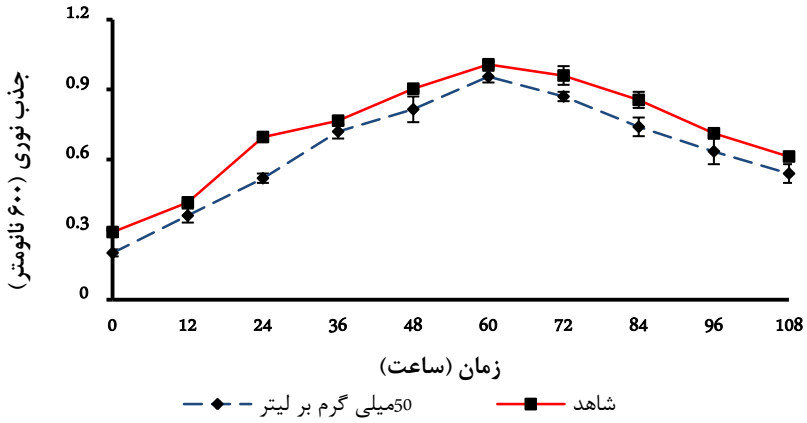


شکل ۱. کلنی شیری رنگ گرم منفی *O. anthropi* در محیط کشت نوترینت آگار(A)، کلنی شیری رنگ باکتری گرم منفی *P. putida* در محیط کشت نمکی (B

جدول ۲. نتایج تست های بیوشیمیایی گونه های مورد پژوهش

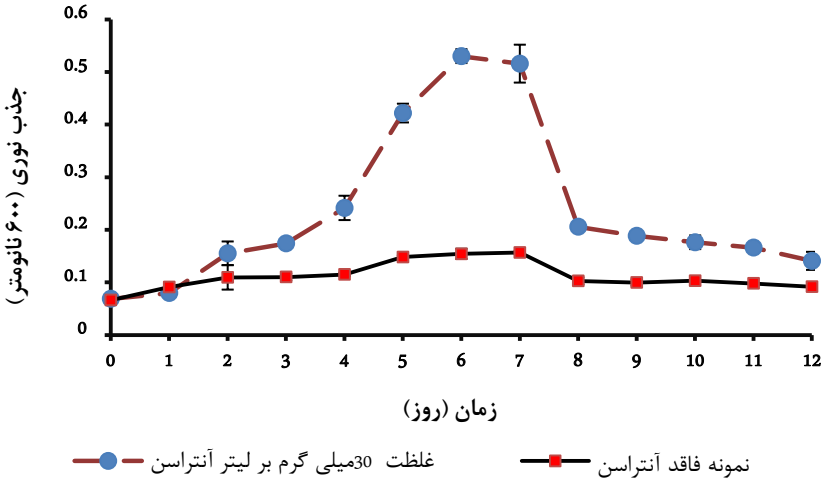
آزمون بیوشیمیایی	*Ochrobactrum anthropi*	*Psedomonas putida*
آزمون گرم	-	-
شکل سلول باکتری	میله ای	میله ای
آزمون اکسیداز	+	+
تولید اندول	-	-
اوره	+	+-
آزمون کاتالاز	+	+
د-کربوکسیلاز	-	-
فنیل آلانین	+	-
سیمون سیترات	+	+
تخمیر لاکتوز	-	-
رشد بر محیط مک کانکی	+	+
KOH	+	+
MR	-	-
VP	-	-
SIM	+	+
TSI	+	-

(



شکل ۲. جذب نوری باکتری *O. anthropi* در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیترسرب

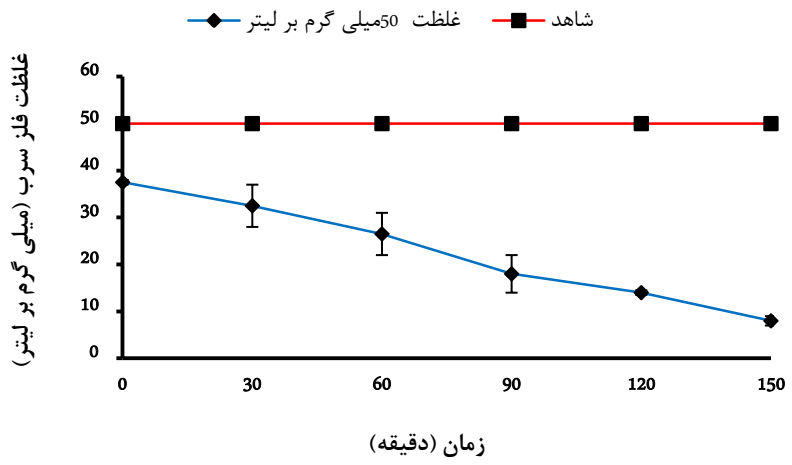
نتایج حاصل از بررسی رشد ۱۲ روزه باکتری *P. putida* در شکل ۳ نشان داد، رشد باکتری بدون فاز تاخیری آغاز و با روند سریعی ادامه یافت، در روز ششم به حداکثر میزان رشد خود رسید. پیک رشد باکتری در نمونه دارای آنتراسن بیشتر از نمونه فاقد آنتراسن بود.



شکل ۳. جذب نوری باکتری *P. putida* در غلظت ۳۰ میلی گرم بر لیتر آنتراسن

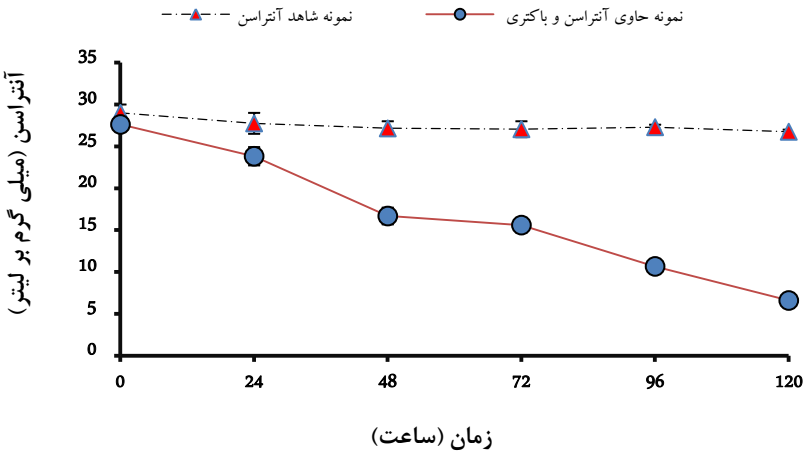
نتایج حاصل از بررسی جذب سرب از محلول فلزی حاوی این فلز توسط باکتری *o.anthropi* در غلظت ۵۰، میلی گرم بر لیتر حاکی از آن بود که باکتری از همان لحظه تلقیح به سرعت فلز را از محلول جذب کرده و میزان آنرا در محلول فلزی کاهش می دهددقایق ابتدایی سنجش بیشترین میزان حذف اندازه گیری شد بگونه ای که در ۳۰ دقیقه ابتدایی میزان سرب از ۵۰ به ۳۲/۵ میلی گرم

در لیتر کاهش یافت. با این حال با گذشت زمان باکتری همچنان جذب فعالی داشته و قادر به حذف سرب از محلول فلزی تا دقایق انتهایی سنجش بود و پس از گذشت ۱۵۰ دقیقه ۸۴ درصد سرب موجود در محلول فلزی را جذب نمود (شکل۴).



شکل۴. منحنی جذب زیستی سرب از محلول توسط باکتری *O. anthropi*

باکتری *P. putida* در ساعات اولیه ورود به محیط کشت MSM مقدار آنتراسن را با سرعت بالایی تا ۲۳/۸۲±۱/۵۴ میلی گرم بر لیتر کاهش داد. پس از آن کاهش تدریجی سوبسترا تا ۱۲۰ ساعت به میزان ۶/۶۰ میلی گرم بر لیتر ادامه یافت که این کاهش نسبت به نمونه شاهد بدون باکتری بسیار چشم گیر بود (شکل ۵).



شکل ۵. تجزیه بیولوژیک آنتراسن موجود در محیط کشت توسط باکتری *P. putida*

جداول ۳ و ۴ عملکرد باکتری *O. anthropi* در حذف فلز سرب از محلول فلزی و باکتری *P. putida* در تجزیه بیولوژیکی آنتراسن در محیط MSM را نشان می دهد. بعد از گذشت ۱۵۰ دقیقه میزان فلز موجود در محلول فلزی از ۵۰ میلی گرم بر لیتر به ۱± ۸ و آنتراسن موجود در محیط کشت

MSM از ۳۰ میلی گرم بر لیتر به ۰/۳۹ ±۶/۶۰ کاهش یافت.

جدول۳. داده های مربوط به تغییرات میزان و درصد سرب در محیط توسط باکتری طی زمان

زمان(دقیقه)	۰	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
میزان سرب موجود در محلول فلزی (میلی گرم بر لیتر)	۳۷/۵ ± ۰/۵	۳۲/۵± ۰/۳۵	۲۶/۵ ± ۰/۴	۱۸ ± ۰/۵۴	۱۴ ± ۰/۵	۸ ± ۱
درصد حذف سرب	۲۵	۳۵	۴۷	۶۴	۷۲	۸۴

جدول۴. داده های مربوط به تغییرات میزان و درصد آنتراسن در محیط توسط باکتری طی زمان

زمان(ساعت)	۰	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
میزان آنتراسن موجود در محیط کشت (میلی گرم بر لیتر)	۲۷/۶± ۰/۵	۲۳/۸۲± ۱/۰۹	۱۶/۶۸± ۱	۱۵/۶۰± ۰/۸۵	۱۰/۶۷± ۰/۶۶	۶/۶۰± ۰/۳۹
درصد حذف آنتراسن	۷/۹۴	۲۰/۵۹	۴۴/۳۷	۴۷/۹۹	۶۴/۴۲	۷۷/۹۸

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر گونه های *O. anthropi* و *P. putida* بعنوان باکتری های مقاوم به فلز سنگین سرب و هیدروکربن آنتراسن از رسوبات آلوده در خلیج فارس جداسازی و توانایی آن ها در حذف این آلاینده ها مورد مطالعه قرار گرفت. *O. anthropi* باکتری گرم منفی باسیلی است و از آنجاییکه عمر شناسایی این جنس به سال ۱۹۸۸ باز می اطلاعات چندانی درباره گونه های این جنس وجود ندارد (Yuan *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). باکتری *Ochrobactrum sp.* توانایی قابل توجهی در حذف آلاینده هایی نظیر فنول (El-Sayed *et al.*, 2003)، آترازین (Laura *et al.*, 1996)، هالوبنزوات (Bongkeuu *et al.*, 2000) و جذب یون های سمی و سنگین (Ozdemir *et al.*, 2003) دارد. مطالعه رشد باکتری *O. anthropi* در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز سرب حاکی از مقاومت بالای این باکتری به فلز سمی سرب می باشد. همچنین نبود تاخیر در آغاز فرایند رشد نشان داد که باکتری قادر است خود را با فلز موجود در محیط سازگار و ضایعات ناشی از حضور فلز را به سرعت بازسازی کند (Garni, 2005). از گونه های مربوط به این جنس میتوان به *O.anthropi* strain YX0703 و *O.tritici* strain AN4 به عنوان دو گونه مقاوم به فلز مس در منطقه خور موسی اشاره

کرد که در سال ۲۰۱۰ توسط Abyar جداسازی شدند.

باکتری *P. putida* گونه دیگریست که از رسوبات آلوده در خلیج فارس جداسازی و شناسایی گردید. *P. putida* جدا شده در این تحقیق نیز قادر به استفاده از آنتراسن بود و میزان رشد آن به ۰/۵۳۰ رسید. همان طور که در شکل ۳ مشخص شده است جمعیت باکتری در طول هفته اول افزایش و سپس رو به کاهش گذاشت. افزایش می تواند به دلیل به دلیل وجود آنتراسن در محیط باشد، از آنجایی که این باکتری از محیط هایی که تنها منبع کربن آن ها آنتراسن بوده است جداسازی شده اند توانایی بالایی در تکثیر مجدد را داشته اند. مطالعات صورت گرفته بر روی گونه های این جنس نشان می دهد که باکترهای *Pseudomonas* با داشتن ژن های موثر توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن هیدروکربن ها دارند در واقع با گذشت زمان جمعیت باکتری فرصت بیشتری دارد تا با آلاینده سازش پیدا کند (Pandey and Gain, 2002).

نتایج حاصل از این پژوهش و مطالعات صورت گرفته بر روی گونه های متعلق به جنس *Ochrobactrum* توسط سایر محققان حاکی از توانایی بالای این جنس در حذف فلزات سنگین است. مطالعه توانایی باکتری *O. anthropi* در حذف فلز سرب نشان داد که این گونه قادر است سرب را به سرعت و بطور فعال تا آخرین لحظات سنجش جذب نماید. باکتری فوق پس از ۱۵۰ دقیقه سرب را در محلول فلزی ۵۰ میلی گرم بر لیتر فلز به میزان ۸۴ درصد کاهش داد. نتایج حاصل از مطالعه آبیار در سال ۱۳۸۹، نشان داد که *O. anthropi* توانایی بالایی در حذف فلز مس از محیط دارد به طوری که گونه مذکور قادر به حذف ۷۲/۶ درصدی این فلز از محلول فلزی با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر مس می باشد. از دیگر گونه های متعلق به جنس *Ochrobactrum* میتوان به گونه *O. intermedium* اشاره کرد که بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط Hasanain و Sultan در سال ۲۰۰۶، این باکتری قادر به حذف ۹۰ درصدی کروم از محلول فلزی می باشد. همچنین این باکتری طی ۲۴ ساعت از محلول فلزی ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر، کروم را به میزان ۳۹ تا ۶۱ درصد جذب می کند.

حداکثر جذب سرب توسط باکتری *O. anthropi* در ۳۰ دقیقه ابتدایی صورت گرفت بگونه ای که پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان فلز از ۵۰ میلی گرم بر لیتر به ۰/۳۵± ۳۲/۵ کاهش یافت. مطالعات Tunali و همکاران در سال ۲۰۰۶، که به بررسی جذب زیستی دو فلز سرب و مس توسط باکتری باسیلوس در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر پرداختند نشان داد که جذب سطحی سریع یونهای سرب و مس در ۱۵ و ۳۰ دقیقه ابتدایی انجام می پذیرد و با گذشت زمان تغییر قابل توجهی در میزان جذب صورت نمی گیرد، که به نظر می رسد با افزایش غلظت یون های فلزی سایت های جذبی روی سطح دیواره سلولی باکتری به سرعت اشغال شده و با گذشت زمان به علت اشباع شدن آنها جذب متوقف شود (Tunali *et al*., 2006). این در حالی است که باکتری *O. anthropi* تا دقایق انتهایی سنجش سرب را فعالانه از محلول فلزی جذب می کند که

یکی از دلایل تاخیر در رسیدن باکتری به زمان تعادل می تواند همین جذب فعال باکتری باشد که تا دقایق انتهایی سنجش ادامه دارد و از آنجایی که در صنعت سرعت عمل فاکتور مهمی بشمار می آید و جذب بیشتر در مدت زمان کوتاه تر از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه تر می باشد، این موضوع قابلیت بالای گونه های مورد مطالعه را برای جذب فلز سرب از محیط و استفاده شدن بعنوان جاذب زیستی نشان می دهد.

نتایج حاصل از آزمایش مجاورت آنتراسن و *P. putida* با استفاده از سنجش جذب ۱۲۰ ساعته مشخص کرد که این گونه از توان جذب بالایی برخوردار است، با افزایش زمان ماند در محیط کشت درصد بیشتری از ترکیب نفتی (آنتراسن) توسط باکتری تخریب گردید. کاهش غلظت آنتراسن تا روز پنجم از سرعت خوبی برخوردار بود (جدول ۳). تحقیقات Andrei و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که *P. Putida* G7جدا شده از خاک قدر تخریب ۹۵ درصد از نفتالن را بعد از ۵ روز در شرایط آزمایشگاهی داراست. Rodrigo و همکاران (۲۰۰۵) ثابت کردند که از بین ۳ باکتری جدا شده از خاک های آلوده پتروشیمی، *P. aeruginosa* در محیط کشت حاوی آنتراسن رشد خوبی داشته و در طی ۲ روز قادر به حل کردن ۵۶ درصد آنتراسن شد. Abd-Elsalam و همکاران (۲۰۰۶) گونه *P. putida* را از مکان های آلوده به نفت در مصر شناسایی و جداسازی نمودند. این ایزوله توانایی تجزیه بالای ۵۰ درصد از کلروفنول و نفتالن را در محیط کشت بعد از ۲۰ ساعت انکوباسیون نشان داد. Kumar و همکاران (۲۰۰۶) تجزیه بیولوژیکی نفتالن توسط *P. putida* را ارزیابی نمودند. آنزیم های متابولیسم کننده این هیدروکربن آروماتیک به روش های دی اکسیژناز نفتالن وابسته است. این گونه با توانایی تجزیه نفتالن به عنوان گونه مفید در تجزیه زیستی معرفی گردید. در گزارشات Safahieh و همکاران (۲۰۱۱) حذف ترکیبات نفتی را با گونه های تجزیه کننده بومی منطقه خور موسی مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. میزان تجزیه نفتالن بعد از ۱۲۰ ساعت توسط *P. putida* (۹۱/۴۸ درصد) گزارش شد. Neeraja و همکاران (۲۰۱۳) نیز موفق شدند در مدت ۷ روز ۷۶ درصد آنتراسن را با تلقیح گونه های *Pseudomonas*به محیط کشت حاوی ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آنتراسن مورد تجزیه بیولوژیکی قرار دهند. در بررسی مقایسه ای نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر محققان محرز گردیده که *Pseudomonas* در تجزیه زیستی آلاینده های آلی در اکوسیستم ها و شرایط مختلف بسیار موثر می باشند (Mittal and Singh, 2009; Neeraja *et al*., 2013) که منطبق بر تحقیق حاضر است.

مطالعه صورت گرفته بر روی رسوبات آلوده در منطقه خلیج فارس به جداسازی گونه *O. anthropi* بعنوان باکتری مقاوم به فلز سرب و گونه *P. putida* بعنوان باکتری مقاوم به ترکیب نفتی آنتراسن منجر گردید. نتایج حاصل از بررسی توانایی باکتری های فوق در رفع آلاینده ها از محیط حاکی از کارایی بالای باکتری *O. anthropi* در جذب زیستی فلز سرب و *P. putida* در تجزیه زیستی هیدروکربن آنتراسن می باشد، بگونه ای که بخش عمده فلز و

هیدروکربن در لحظات ابتدایی سنجش توسط باکتری از محیط حذف میگردد. همچنین این روند توسط باکتری تا لحظات پایانی شنجش بطور فعال ادامه می یابد. در نهایت باکتری *O. anthropi* و *P. putida* بترتیب قادر به حذف ۸۴ و ۷۷/۹۸ درصدی سرب و آنتراسن از محلول فلزی و محیط کشت حاوی آنتراسن می باشند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با پشتیبانی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام شده است. بدینوسیله مراتب تشکر مؤلفین ازمسوولین مربوطه ابرازمیگردد.

References

Abyar, a., 2010. Isolation and Identification of marine aerobic bacteria resistant to Copper and Cadmium in mahshahr port and determination of their ability in metal biosorption from the surrounding medium. M. Sc. Thesis. 114.[in Persian]

Abd-Elsalam, H., Shamseldin, A., Hafez, E.E., 2006. PAH degradation by two native Egyptian strains *Flavobacterium* sp. And *Pseudomonas putida*. Journal of Applied Scienes Research 11, 1092-1098.

Andrei, E., Irina, F., Alexander, V., Irina, A., Konstantin, I., Anatoly, V., Alexander, M., 2004. Efficiency of naphthalence biodegradation by *pseudomonas putida* G7 in soil. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, 562-569.

Anisuddin, S., Alhashar, N. and Tahseen, S., 2005. Prevention of oil spill pollution in seawater using locally available materials. Arabian Journal for Science Engineering 30(2), 143-152.

Azza, A.A., Wesam, A.H., Hedayat, M.S., Ghada, A.A.F., 2009. Biosorption of some heavy metal ions using bacterial species isolated from agriculture waste water drains in Egypt. Journal of Applied Sciences Research 4, 372-383.

Bongkeuu, S., Palleroni, N. J., Haggblom, M. M., 2000. Isolation and characterization of diverse halobenzoate degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology 66, 3446-3453.

Chovanova, K., Sladekova, D., Kmet, V., Proksova,M., Harichova, J., Puskarova, A., Polek, B., Ferianc, P., 2004. Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. Biological Bratislava 6, 817-827.

Dzairi, F.Z., Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Taoufik, J., Talbi, M., Loutfi, M., Lee, K., Blaghen, M., 2004. Bacterial volatilization of mercury by immobilized bacteria in fixed and fluidized bed bioreactors. Annals of Microbiology 54(4), 353-364.

El-Sayed, W. S., Ibrahim, M. K., Abu-Shady, M., El-Beih, F., Ohmura, N., Saiki, H., Ando, A., 2003. Isolation and identification of a novel strain of the genus Ochrobactrum with phenol-degrading activity. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 310-312.

Garni, S., 2005. Biosorption of lead by gram-ve capsulated and non-capsulated bacteria. Water SA 3, 345-349.

Garrity, G.M., Winters, M., Searles, D.B., 2002. Taxonomic outline of the procaryotes Bergeys

manual of systematic bacteriology. 2th Edition, 1-350 p.

Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K. and Mohapatra, H., 2000. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Current Science 78, 967–73.

Howard, H., 2002. Human health and heavy metals exposure. The Environment and Human Health.Chapter 4, 235 – 255.

Juhasz, A.L., Stanley, G.A and Britz, M.L., 2000. Degradation of High Molecular Weight PAH_S in Contamination Soil by a Bacterial Consortium: Effects on Microtox and Mutagenicity Bioassays. Bioremediation Journal 4(4), 271-283.

Kim, S.U., Cheong, Y.H., Seo, D.C., Hur, J.S., Heo, J.S., Cho, J.S., 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus spp.*). Water Science and Technology 55(1-2), 105-111.

Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S. and Ilzins, O.A., 2006. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. Polish Journal of Microbiology 55, 139-146.

Laura, D., Socio, G. D., Frassanito, R., Rotilio, D., 1996. Effects of atrazine on *Ochrobactmm anthropi* membrane fatty acids. Applied and Environmental Microbiology. 62, 2644-2046.

Leung, W.C., Wong, M-F., Chua, H., Lo, W., Yu., P.H.F., Leung, C.K., 2000. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. Water Science and Technology 14(12), 233-240.

Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. Critical Reviews Biotechnology 25,113-52.

Mittal, A., p., Singh., 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crud oil spills. Indian Journal of Experimental Biology 47, 760 -765.

Neeraja, P., Madhusudhan, N.CH., Soma shanker, M., Ravikumar, M., 2013. Isolation and characterization of anthracene degrading bacteria from soil contamination with petroleum wastes. Inernational Journal of Research in Phamaceutical sciences 3(4), 380-385.

Nnamchi, C.I., Obeta, J.A.N., Ezeogu and L.I., 2006. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology 2(3), 181-190

Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R., and Cosar, T., 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. Bioresource Technology 90, 71-74.

Pajohande, A. and Shariati Torbghari, A. 1999 . Toxicity of treatment and diagnosis .Tehran: Chehreh Publication.pp. 253-4.

Pandey, G.; Gain, R.K., 2002. Marine views bacterial chemotaxis toward environmental pollution trans: role in bioremediation. Applid and environmental microbiology Dec.2002, pp, 5789-5795.

Rodrigo, J.S., Jacques, Eder C. Santos, Fatima M., Bento, Maria C.R., Peralba, Pedro, A., Selbach, Enilson, L.S., Flavio, Sa, Camargo, A.O., 2005. Anthracen e biodegradation by *Pseudomonas* sp. Isolated from a petrochemical sludge landfarming site. International Biodeteriora tion and Biodegradation 56, 143-150.

Saeed, A., Iqbal, M., 2003. Bioremoval of cadmium from aqueous solution by black gram husk (*cicerarientinum*) water Research 37, 3472-348.

Safahieh, A.R., Mojodi, F., Zolgharnein, H. 2011.

evalution and comparision of the ability of indigenous pseudomonas bacteria from musa creek to remove poly aromatic compound. journal of environmental studies. 37. [in Persian]

Samanta , S.K.; Singh , O.V. ; Jain P.K., 2002 , polycyclic aromatic hydrocarbons : environmenta pollution and bioremediation . Trend in biotechnology 20(6), 243-8.

Shape I, Rayner J. L., 2005. Investigation Of Evaporation An biodegradation Of Feul Spills In Antractia. Environmental International 26, 233-240.

Shirdam, R., Khanafari, A., Tabatabaee, A., 2006. Cadmium, nickel and vanadium accumulation by three strains of marine bacteria. Iranian Journal of Biotechnology 4(3), 180-187.

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

Sultan, S., Hasnain, S., 2006. Characterization of an *Ochrobactrum intermedium* strain STCr-5 manifesting high level Cr (VI) resistance and reduction potential. Enzyme and Microbial Technology 39, 883-888.

Tunali, S., Cabuk, A., Akar, T., 2006. Removal of Lead and Copper from Aqueous Solutions by Bacterial Strain Isolated from Soil. Chemical Engineering Journal 115, 203-211.

Wick, A.F., Haus, N.W., Sukkariyah, B.F., Haering, K.C., Daniels, W.L., 2011. Remediation of PAH contaminated soils and sediments: a literature review. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Yuan, Y. J., Lu, Z. X., Wu, N., Huang, L. J., Lu, F. X., and Bie, X. M., 2005. Isolation and preliminary characterization of a novel nicotine-degrading bacterium, *Ochrobactrum intermedium* DN2. International Biodeterioration and Biodegradation 56, 45-50.

Zhou, M.H., Han, F.F., Li, J., Zhou, X.W., 2008. Isolation and identification of a novel alginate-degrading bacterium, *Ochrobactrum* sp. Songklanakarin Journal Science Technology 30(2), 135-140.

محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵ صفحه ۷۵۶

A Study of the Ability of Bacteria Isolated from Persian Gulf Sediments to Biologically Remove Lead and Anthracene

Fatemeh Shahaliyan[1], Razieh Lamoochi [1*],Alireza Safahieh[2] , Negin Salamat[2], Fatemeh Mojoudi[3], Hajar Abyar[4], Mostafa Zaredoost[5]

1) *Master graduate of Marine pollution, Khorramshahr university of marine science and technology. Department of Marine Biology.*
2) Department of Marine Biology, School of Marine science Khorramshahr University of marine science and technology. Khorramshahr, IRAN.
3) PhD Candidate in Environmental Pollution, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4)PhD Candidate in Environmental Pollution, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
5) PhD Candidate in Environmental Management, Faculty of Environment and Energy, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 16-Jul.-2014 Accepted: 2-Aug-2016

Abstract

This study aimed to isolate and identify the species *Ochrobactrum anthropi* and *Pseudomonas putida* as indicators for measuring lead absorption and degradation of anthracene in laboratory conditions. The results showed that the mentioned species could grow well in 50 mg/l of lead and 30 mg/l of anthracene. The maximum growth at concentrations of 50 mg/l of lead and 30 mg/l of anthracene was measured 1.39 and 0.530, respectively. The results of the study of the ability of lead uptake by *O. anthropi* at a concentration of 50 mg/l and anthracene removal by *P. putida* at a concentration of 30 mg/l indicated that the mentioned bacteria started absorbing lead and anthracene at the time of inoculation and quickly reduced their concentrations in the solution. Removal of lead and anthracene by *Ochrobactrum anthropi* and *Pseudomonas putida* from the metal and hydrocarbon solutions continued actively till the final moments of measurement and at the end of the experiment, 84% of lead and 77.986% of anthracene were removed.

Keywords: biosorption, heavy metals, anthracene, *P. putida* ،*O.anthropi*

* Corresponding author: Tel: +98-937688313, E-mail: raziehlamoochi@yahoo.com