نهمین کنفرانس ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی فیزیولوژی گیاهی
9th National and 1st International Conference of Plant Physiology
29-27 بهمن 1404، دانشگاه گیلان

جداسازی و ارزیابی توان تجزیه پیرن و فنانترن توسط باکتری‌های اندوفیت گیاه ذرت (*Zea mays* L.)

نوبرحاجی حسینلو [۱*]، سید یحیی صالحی لیسار [۱]، غلامرضا زرینی [۲و۳]
۱ گروه زیست‌شناسی گیاهی، سلولی و مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲ گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳ گروه پژوهشی بیوتکنولوژی میکروبی، مرکز تحقیقات علوم زیستی و بیوتکنولوژی (RCBB)، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای(PAHs) گروهی از هیدروکربن‌های آروماتیک هستند که از دو یا چند حلقه بنزن متصل به هم تشکیل شده‌اند. گیاهان می‌توانند PAHها را جذب کرده و آنها را در ریشه‌ها و شاخه‌های خود تجزیه کنند. نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌هایی که با گیاهان ارتباط دارند، از جمله باکتری‌های اندوفیت(غیر بیماری‌زا)، در تجزیه ترکیبات سمی در بافت‌های گیاهی نقش دارند. اهداف این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت تجزیه‌کننده پیرن و فنانترن از گیاهان ذرت تیمار شده با این مواد و همچنین ارزیابی پتانسیل آنها برای تجزیه PAHs بود. گیاهان ذرت (*Zea mays* L.) در پرلیت حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر فنانترن و پیرن کشت داده شدند. متعاقباً، باکتری‌های اندوفیت از بافت گیاه استخراج شده و با ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر فنانترن و پیرن در خاک تیمار گردیدند تا مقاومت و همچنین پتانسیل تجزیه زیستی آنها ارزیابی شود. شناسایی باکتری‌ها با تعیین توالی ژن ۱۶SrRNA انجام شد. از آنالیز HPLC برای ارزیابی میزان تجزیه زیستی PAHs استفاده شد. نتایج نشان داد که تمام باکتری‌های جدا شده از گیاهان شاهد و تیمار شده با PAHs توانایی تجزیه پیرن و فنانترن را داشتند. بنابراین، می‌توان فرض کرد که بخشی از توانایی تجزیه PAHها در بافت‌های گیاه ذرت مربوط به عملکرد آندوفیت‌ها است.

مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) گروهی از هیدروکربن‌های آروماتیک هستند که از دو یا چند حلقه بنزن متصل به هم تشکیل شده‌اند که از طریق فرآیندهای طبیعی مانند آتش‌سوزی جنگل‌ها و فوران آتشفشان‌ها و همچنین فعالیت‌های انسانی مانند احتراق سوخت‌های فسیلی به محیط زیست آزاد می‌شوند. با توجه به مشکلات جدی PAHها، مانند ویژگی‌های سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا بودن آنها، علاقه به توسعه روش‌هایی برای حذف یا تجزیه PAHها از محیط زیست در طول دهه گذشته افزایش یافته است. این ترکیبات می‌توانند باعث ایجاد آسیب‌های حاد و مزمن در گیاهان در سطوح مختلف بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، آناتومیکی و مولکولی شوند .بسیاری از میکروب‌ها می‌توانند PAHها را به آب و دی اکسید کربن تجزیه کنند یا آنها را به ترکیباتی با سمیت کمتر یا بدون سمیت تبدیل کنند (Toledo et al., 2006).
جذب، انتقال و توزیع ترکیبات PAH (پیرن و فنانترن) توسط گیاه ذرت قبلاً بررسی شده است. نتایج نشان داده است که غلظت PAHها در گیاهان می‌تواند با گذشت زمان تغییر کند، که این به دلیل جذب و تجزیه این ترکیبات توسط گیاهان ذرت بوده است (Houshani et al., 2019) و این احتمال مطرح شده است که اندوفیت‌ها در تجزیه این ترکیبات نقش دارند. بنابراین، اهداف این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های موجود در گیاهان ذرت رشد یافته در پرلیت حاوی ترکیبات PAHs (فنانترن و پیرن) و همچنین ارزیابی تجزیه این ترکیبات توسط باکتری‌های جدا شده بود.

مواد و روش‌ها

۲-۱-تیمار: مقادیر مورد نیاز پیرن و فنانترن (Merck, Germany) در اتانول حل شدند تا ۷۵ میلی‌گرم در لیتر برای هر ترکیب تهیه شود. محلول به پرلیت استریل اضافه و کاملاً مخلوط شد. پس از تبخیر اتانول به مدت ۷۲ ساعت برای کشت گیاه مورد استفاده قرار می گیرد(سه تکرار برای هر تیمار پیرن و فنانترن) .
۲-۲- کشت گیاه: بذرهای ذرت از مرکز تحقیقات کشاورزی ایران (کرج) تهیه شدند. بذرهای استریل شده در پرلیت استریل حاوی PAH و شاهد در عمق یک سانتی‌متر کشت شدند. گیاهان ۳ روزه به مدت ۳ هفته به اتاقک‌های رشد با شرایط کنترل (۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد، دوره نوری ۱۶/۸ ساعت روشنایی/تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰٪) منتقل شدند. گیاهان پس از ۲۱ روز برداشت و برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت مورد استفاده قرار گرفتند.
۲-۳- جداسازی و کشت باکتری‌های اندوفیت: باکتریهای اندوفیت از ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهان شاهد و همچنین گیاهان تیمار شده با پیرن و فنانترن جداسازی شدند.
۲-۴- تیمار باکتری‌های جدا شده با PAHها: هر یک از باکتری‌های جدا شده در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت نمک‌های معدنی (MSM) حاوی ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر پیرن یا فنانترن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در محیط کشت، کشت داده شدند. سپس نمونه‌ها به انکوباتور شیکردار منتقل شدند و به مدت ۱۰ روز با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تکان داده شدند.
۲-۵- استخراج فنانترن و پیرن از محیط کشت و آنالیز HPLC: برای این منظور، ۱۵ میلی‌لیتر اتر نفت به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. پس از ایجاد فازهای آلی و آبی، فاز آبی دور ریخته شد. سپس ۱۹۳/۱ گرم $NaSO_4$ به فاز آلی حاوی فنانترن یا پیرن اضافه شد. حلال آلی تحت شرایط آزمایشگاهی کاملاً تبخیر شد و بقایای بلورین فنانترن یا پیرن در متانول (Merck, Germany, HPLC grade) حل شدند و تا زمان آنالیز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. فنانترن و پیرن با استفاده از دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفتند.
۲-۶- شناسایی مولکولی باکتریهای موثر در تجزیه PAHها: پس از ارزیابی نتایج آنالیز HPLC، باکتریهایی که توانایی بالایی در تجزیه PAHs داشتند، شناسایی شدند. DNA باکتریها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت زیست آسیا، ایران) استخراج شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و برای تعیین توالی و هم‌ترازی محصولات PCR از نرم‌افزار BLAST استفاده شد. شماره دسترسی توالی‌ها با ارسال آنها به پایگاه داده NCBI به دست آمدند.
۲-۷- تحلیل آماری
تجزیه و تحلیل آماری تمام داده‌ها پس از پردازش توسط صفحه گسترده Microsoft Excel 2010 (نسخه ۱۸) با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای توکی ($p \leq 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

۳. نتایج و بحث
۳-۱- جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت تجزیه‌کننده PAHs
۱۴ باکتری اندوفیت تجزیه‌کننده فنانترن و پیرن از ریشه، ساقه و برگ‌های گیاهان ذرت شاهد و تیمار شده با PAHs خالص‌سازی شدند. توان تجزیه باکتریها ۲/۴۵ تا ۱۰۰ درصد بود. در میان باکتری‌های جدا شده، چهار باکتری بیشترین اثربخشی را در تجزیه پیرن و فنانترن داشتند. بر این اساس، *Brevibacillus brevis* سویه PHE1 و*Bacillus zhangzhouensis* سویه PHE2 با شماره‌های دسترسی PQ656109 و PQ656146 به طور مؤثر فنانترن را تجزیه کردند (به ترتیب ۳/۹۲ و ۹۴ درصد)؛ و *Bacillus pumilus* سویه PYR1 و سویه *Bacillus licheniformis* سویه PYR2 با شماره‌های دسترسی PQ656135 و PQ669613 بالاترین توانایی را در تجزیه پیرن نشان دادند (به ترتیب ۵/۸۸ و ۱۰۰ درصد). توالی‌های 16S rRNA جدایه‌ها هم‌تراز شده و در مقایسه با توالی‌های گونه‌های باکتریایی مرتبط، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۳-۱- میزان تجزیه پیرن توسط باکتریهای جدا شده از گیاهان ذرت شاهد و تیمار شده با **PAH**. غلظت اولیه پیرن در تمامی محیط ها ۱۶۰ میلی گرم در لیتر بود. . مقادیر میانگین سه تکرار **SD**± است. حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری است ($p \geq$ ۰۵/۰)

	تیمار	اندام	باقیمانده فنانترن ($mg\ L^{-1}$)	میزان تجزیه(%)
شاهد	-	-	۲۶/۲ ± ۱/۸۶^{a}	۸۳/۵
B1	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۱۴/۸ ± ۲/۳۳^{efg}	۹۰/۷
B2	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۱۵/۷ ± ۲/۲۹^{def}	۹۰/۱
B3	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۱۴/۷ ± /۹۲^{efg}	۹۰/۸
B4	تیمار شده با فنانترن	ریشه	۹/۶۰ ± ۰/۷۴^{g}	۹۴
B5	تیمار شده با فنانترن	ریشه	۱۲/۳ ± ۱/۷۲^{fg}	۹۲/۳
B6	تیمار شده با پیرن	اندام هوایی	۱۲/۸ ± ۱/۸۲^{efg}	۹۲
B7	تیمار شده با پیرن	اندام هوایی	۲۱/۲ ± ۱/۶۹^{abcd}	۸۶/۷
B8	تیمار شده با پیرن	ریشه	۲۲/۷ ± ۲/۱۴^{abc}	۸۵/۸
B9	تیمار شده با پیرن	ریشه	۱۵/۱ ± ۰/۹۲^{efg}	۹۰/۵
B10	شاهد	ریشه	۲۶ ± ۲/۵۳ ^{a}	۸۳/۷
B11	شاهد	ریشه	۲۶/۱ ± ۱/۸۰^{a}	۸۳/۶
B12	شاهد	ریشه	۱۷/۳ ± ۱/۳۰ ^{cdef}	۸۹/۱
B13	شاهد	اندام هوایی	۱۸/۵ ± ۱/۴۱^{bcde}	۸۸/۴
B14	شاهد	اندام هوایی	۲۳/۷ ± ۱/۵۲ ^{ab}	۸۵/۲

جدول ۳-۲- میزان تجزیه فنانترن توسط باکتری های جدا شده از گیاهان ذرت شاهد و تیمار شده با PAH. غلظت اولیه فنانترن در تمامی محیط ها ۱۶۰ میلی گرم در لیتر بود. مقادیر میانگین سه تکرار **SD**± است. حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری است ($p \geq$ ۰.۰۵).

استرین	تیمار	اندام	باقیمانده پیرن ($mg\ L^{-1}$)	میزان تجزیه(%)
بدون باکتری(شاهد)	-	-	۱۰۸/۶±۳/۶۹^{a}	۳۲/۱
B1	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۶۲ ± ۴/۸۶^{c}	۶۱/۲
B2	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۴۱/۶± ۵/۱۸^{de}	۷۴
B3	تیمار شده با فنانترن	اندام هوایی	۵۷/۳ ± ۵/۷۲^{cd}	۶۴/۲
B4	تیمار شده با فنانترن	ریشه	۵۲/۷±۴/۳۶^{cde}	۶۷
B5	تیمار شده با فنانترن	ریشه	۳۷/۷ ± ۳/۰۳ ^{def}	۷۶
B6	تیمار شده با پیرن	اندام هوایی	۱۸/۵± ۲/۷۸^{fg}	۸۸/۵
B7	تیمار شده با پیرن	اندام هوایی	۳۵/۹ ± ۲/۷۴^{ef}	۷۷/۵
B8	تیمار شده با پیرن	ریشه	۳۵/۵ ± ۲/۷۳^{ef}	۷۷/۷
B9	تیمار شده با پیرن	ریشه	۰ ± ۰^{g}	۱۰۰
B10	شاهد	ریشه	۸۷/۷ ± ۲/۴۷^{b}	۴۵/۲
B11	شاهد	ریشه	۶۷/۷ ± ۲/۶۰^{bc}	۵۷/۶
B12	شاهد	ریشه	۵۶/۷ ± ۱/۸۸^{cd}	۶۴/۵
B13	شاهد	اندام هوایی	۶۳/۹ ± ۲/۹۶^{c}	۶۰
B14	شاهد	اندام هوایی	۶۸/۵± ۳/۲۸^{bc}	۵۷/۱

طبق نتایج، باکتری‌های جدا شده از گیاهان تیمار شده با پیرن و فنانترن، ظرفیت بیشتری برای تجزیه PAHs نسبت به باکتری‌های جدا شده از گیاهان شاهد دارند. این توانایی بالاتر احتمالاً به دلیل افزایش توانایی باکتری‌های جدا شده از گیاهان تیمار شده با PAHs در تجزیه این مواد است. توانایی باکتری‌ها برای تجزیه زیستی PAHs به ویژگی‌های خاص گونه‌های باکتریایی بستگی دارد که ممکن است در طول سازگاری با محیط آلوده تغییر کند (Rabodonirina et al., 2019). به طور مشابه، گزارش‌های متعددی نقش گونه‌های باسیلوس را در تجزیه آلاینده‌ها، به ویژه در شرایط محیطی نامساعد، ثابت کرده‌اند .گونه‌های باسیلوس می‌توانند PAHها را تجزیه کنند، زیرا آنها دارای آندوسپورهایی هستند که در برابر PAHها مقاوم می‌باشند. نشان داده شده که *B. safensis* ZY16 می‌تواند به طور مؤثر فنانترن و پیرن را به ترتیب ۴/۵۹ و ۶/۲۷ درصد تجزیه کند (Tao et al., 2019).

منابع

Houshani, M., Salehi-Lisar, S Y., Motafakkerazad, R. and Movafeghi A. 2019. Uptake and distribution of phenanthrene and pyrene in roots and shoots of maize (*Zea mays L.*). Environmental Science Pollution Research; **26**:9938-9944.

Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., Merhaby, D., Net, S and Ouddane, B. 2019. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using Pseudomonas and Bacillus strains isolated from oil spill sites. Journal of Environmental mamagement; **232**:1-7.

Toledo, F., Calvo, C., Rodelas, B. and González-López, J. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Systematic and Applied Microbiology; **29**:244- 252.

Tao, W., Jie, X., Jian, L., Wei-Hua, G., Xiao-Bin, L., Jiang-Bao, X., Wen-Jun, X., Zhi-Gang, Y., Yu-Miao, Z. and Ren-Qing, W. 2019.Characterization and Initial Application Endophytic *Bacillus safensis* Strain ZY16 for Improving Phytoremediation of Oil-Contaminated Saline Soils. *Frontiers in Microbiology*; **10**:991.