بررسی پتانسیل باکتری ویبریو فیشری (*Vibrio fischeri*) برای پایش آلودگی نفتی در محیط‌های آبی

مرضیه میرجانی[۱]، محسن سلیمانی[۱*] و وحید سالاری[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱)

چکیده

نگرانی‌های فزاینده نسبت به آلودگی آب و اثرات مضر بالقوه آن بر انسان، تلاش‌های جدی را برای توسعه روش‌های پایش زیستی قابل اعتماد برانگیخته است. آنالیز بیولومینسنت یکی از نویدبخش‌ترین روش‌های سریع برای پایش زیستی محیط زیست است، زیرا سیستم لومینسنت حتی به مقدار کم آلاینده‌ها شدیداً حساس است. هدف پژوهش حاضر، سنجش سمیت ترکیبات نفتی با استفاده از باکتری ویبریو فیشری (*Vibrio fischeri*) است. الگوی رشد باکتری در محیط کشت فتوباکتریوم براث با اندازه‌گیری تراکم سلولی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و مشخص شد که زمان بهینه رشد باکتری حدوداً ۱۸-۱۶ ساعت پس از تلقیح بود. همچنین تأثیر پارامترهای محیطی مانند دما، pH و غلظت‌های مختلف نفت بر رشد و مقدار لومینسانس باکتری ویبریو فیشری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط بهینه رشد باکتری بعد از ۱۶ ساعت شامل دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH= ۷ بود. همچنین رشد و شدت لومینسانس باکتری ویبریو فیشری تابعی از غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در محیط بود که در غلظت‌های نفت بیش از چهار درصد وزنی حجمی به‌میزان قابل توجهی کاهش یافت؛ بنابراین باکتری ویبریو فیشری پتانسیل استفاده برای پایش آلاینده‌های نفتی در محیط‌های آبی را داراست.

واژه‌های کلیدی: ویبریو فیشری، پایش زیستی، باکتری‌های بیولومینسنت، آلاینده‌های نفتی، آلودگی آب

۱- گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲- دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی اصفهان
*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: m.soleimani@iut.ac.ir

مقدمه

موضوع آلودگی آب به یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی عصر حاضر تبدیل شده است. آلودگی کلی آب ناشی از آلاینده‌های آلی و معدنی در اصل ناشی از شهرنشینی، صنعتی شدن، کشاورزی و افزایش جمعیت انسان است که در قرن اخیر مشاهده شده است (۱۰). یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های آلی، نفت و ترکیبات مشتق شده از آن است (۲۲). هیدروکربن‌های نفتی آلودگی‌های زیست‌محیطی گسترده‌ای دارند. مقادیر فراوانی از نفت و فراورده‌های آن سالانه تولید و تصفیه می‌شود و در خشکی و دریا حمل می‌شود. درنتیجه، خطرات و نگرانی‌ها در مورد آلودگی هیدروکربن نفتی خاک و آب همراه با اثرات سمی آنها در اکوسیستم‌ها قابل توجه است (۱۹). انتشار هیدروکربن‌ها به محیط زیست، به‌طور تصادفی یا به‌علت فعالیت‌های انسانی، عامل اصلی آلودگی آب و خاک است (۳). نشت‌های نفتی دریایی گسترده به‌طور مرتب در دهه های اخیر رخ داده است و موجب وارد شدن آسیب زیادی به زیستگاه‌های دریایی، ساحلی و زمینی، اثرات اقتصادی بر ماهی-گیری، پرورش آبزیان و گردشگری و از دست دادن منابع انرژی شده است. تراوش نفت از طریق خطوط لوله، پالایشگاه‌ها و تأسیسات ذخیره‌سازی و رواناب حاصل از میدان‌های نفتی و مناطق پالایشگاهی و در برخی از موارد فاضلاب پالایشگاه‌های نفت و کارخانه‌های پتروشیمی موجب آلودگی منابع آب می-شود (۱۶).

آلودگی محیط‌های طبیعی یک مشکل جهانی است که سلامتی انسان‌ها و سایر موجودات را تهدید می‌کند. روش‌های آنالیز شیمیایی یا فیزیکی پیشرفته اجازه می‌دهد تا اندازه‌گیری غلظت‌های تعداد زیادی از آلاینده‌ها با دقت و حساسیت بالا انجام شود که می‌توان به روش‌هایی مانند طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP)، کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی مایع طیف-سنج جرمی (LC-MS) اشاره کرد. این روش‌های پرهزینه اغلب نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پیچیده و تحلیلی و همچنین عملیات آماده‌سازی نمونه یا استخراج گسترده از زمینه محیطی دارند. مهم‌تر از همه، این روش‌ها قادر به تشخیص قابلیت دسترسی زیستی آلاینده‌ها نیستند، زیرا غلظت کل آلاینده‌ها معمولاً با اثر واقعی آنها بر موجودات زنده همبستگی ندارد. آنالیزهای شیمیایی اطلاعاتی راجع به سمیت نمونه در اختیار قرار نمی‌دهند (۷ و ۱۲). به‌غیر از روش‌های شیمیایی، روش‌های زیستی یا پایش زیستی به‌طور فزاینده‌ای برای ارزیابی کیفیت آب سطحی مورد استفاده قرار می گیرند. به‌دلیل امکان حذف مرحله اولیه آماده‌سازی نمونه، آنالیزهای انجام شده با استفاده از چنین روش‌هایی هزینه و وقت کمتری مصرف می‌کنند. هدف از پایش زیستی ارزیابی وضعیت محیط طبیعی و سطوح آلودگی است. این روش از گیاهان و حیوانات استفاده می‌کند که به‌عنوان شاخص‌های زیستی عمل می‌کنند. روش‌های پایش زیستی به پنج گروه اصلی روش‌های اکولوژیکی، روش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، آزمایش‌های زیستی کنترل شده، آلودگی در بافت‌های زیستی و روش‌های بافت‌شناسی و ریخت‌شناسی تقسیم می‌شوند (۲۴).

برای ارزیابی سطوح آلودگی محیطی می‌توان از حسگرهای زیستی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها یا زیست سنجی‌ها استفاده کرد (۲۸). زیست‌سنجی شامل آزمون‌هایی است که از موجودات زنده به‌عنوان شاخص استفاده می‌کنند. این روش به‌طور گسترده به‌منظور شناسایی میزان سمیت مواد شیمیایی یا محصولات تجاری، و آلودگی زیست‌محیطی استفاده می‌شود. زیست‌سنجی‌ها امکان ارزیابی تغییرات در فیزیولوژی یا رفتار موجودات زنده را فراهم می‌کنند که ناشی از تنش‌های القا شده به‌وسیله ترکیبات شیمیایی سمی یا زیستی است که می‌توانند باعث اختلال در متابولیسم شوند (۱۸). به‌طور کلی آزمون‌های زیستی با استفاده از هر دو سلول‌های پروکاریوتی (باکتری‌ها) و یوکاریوتی انجام می‌شوند، به‌علاوه از موجودات چندسلولی مانند جلبک‌ها، صدف‌ها، سخت‌پوستان و ماهی‌ها نیز در این آزمون‌ها استفاده می‌شود. با این‌حال، آزمون‌های زیستی با استفاده از موجودات چندسلولی هزینه‌های بالا و دوره‌های تولید مثلی طولانی نیاز دارد. علاوه بر این، ممکن است مسائل اخلاقی در مورد ماهی، پرندگان و پستانداران به‌علت قربانی شدن حیوان طی آزمایش‌ها وجود

داشته باشد. بنابراین، آزمون‌های زیستی با استفاده از سلول‌های باکتریایی به‌ویژه آزمون‌های بیولومینسنت یا نورافشانی باکتریایی به‌دلیل حساسیت بالا و سهولت کاربرد همراه با کاهش هزینه و صرفه‌جویی در زمان ترجیح داده می‌شود که می‌تواند برای پیش‌غربالگری نمونه‌های آبی آلوده استفاده شود (۱ و ۲۴). پارامتر اصلی اندازه‌گیری در زیست‌سنجی بیولومینسنت، لومینسانس است. باکتری‌های بیولومینسنت وقتی در یک محیط مطلوب قرار می‌گیرند، نور منتشر می‌کنند. لومینسانس تحت شرایط طبیعی یک شاخص حساس از سمیت بیگانه‌زی برای میکروارگانیسم‌ها است؛ زیرا به‌طور مستقیم با تنفس از طریق زنجیره انتقال الکترون همراه است و درنتیجه وضعیت متابولیک سلول را منعکس می‌کند؛ بدین معنی که با مهار زنجیره انتقال الکترون مانع از وضعیت متابولیک سلول می‌شود. درصورت حضور مواد سمی لومینسانس کاهش می‌یابد. هرچه میزان سمیت بالاتر باشد مقدار نور منتشر شده توسط باکتری‌ها کمتر می‌شود (۸).

مهار نور طبیعی باکتری‌های لومینسنت توسط مواد سمی بیش از ۳۰ سال پیش به‌عنوان روشی برای پایش سمیت نمونه‌های آبی پیشنهاد شد (۹). در حال حاضر سنجش‌های زیستی با استفاده از باکتری‌های بیولومینسنت طبیعی از جمله *Vibrio fischeri*، *Vibrio harveyi*، *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas leiognathi* به‌طور گسترده در آزمون‌های سمیت به‌کار می‌روند (۱۴).سنجش مهار بیولومینسانس می‌تواند به‌منظور ارزیابی سمیت ترکیبات منفرد و مخلوطی از ترکیبات آلی و غیرآلی به‌کار برده شود. این آزمون زیستی تقریباً برای تمام انواع نمونه‌ها از جمله نمونه‌های آب سطحی و آب زیرزمینی، فاضلاب، پساب و رسوبات قابل کاربرد است. سنجش مهار بیولومینسانس به‌عنوان یک ابزار غربالگری سریع و حساس به‌منظور تعیین و شناسایی سمیت پساب در پساب‌های صنعتی مختلف از جمله پساب رنگی صنعت نساجی و کارخانه کاغذسازی استفاده شده است (۲۱).

نفت خام ممکن است پیچیده‌ترین و متغیرترین مخلوط برای ارزیابی سم‌شناسی باشد، زیرا شامل هزاران ترکیب در غلظت‌هایی است که اغلب تعیین آن مشکل است. بیشتر پژوهش‌های سم شناسی در زمینه نفت خام روی قسمت قابل حل در آب تأکید دارند زیرا بخشی است که به سهولت وارد محیط آبی شده و می تواند منجر به آسیب‌های فوری و حاد در موجودات آبزی شود (۱۷). به‌منظور سنجش سمیت ترکیبات نفتی، تحقیقات مختلفی انجام شده ولی پژوهش حاضر جزء اولین تحقیقاتی است که سمیت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) را با استفاده از باکتری بیولومینسانس مورد بررسی قرار داده است و این مورد می‌تواند وجه تمایز این تحقیق نسبت به سایر تحقیقات انجام گرفته باشد. با توجه به اینکه یکی از باکتری‌های معمول در سنجش بیولومینسنت باکتری ویبریو فیشری (به‌تازگی با نام آلیویبریو فیشری) است، این پژوهش با هدف بررسی پتانسیل این باکتری برای سنجش سمیت ترکیبات نفتی در محیط آبی و بررسی برخی پارامترهای محیطی بر رشد و نورافشانی باکتری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری

ویبریو فیشری یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، تاژک‌دار و غیر بیماری‌زا است که به‌خوبی شناخته شده و در سراسر جهان پراکنده شده است و ترجیحاً در آب‌های معتدل و نیمه‌گرمسیری یافت می‌شود. این باکتری می‌تواند در یک وضعیت پلانکتونی (آزادزی) یا به‌صورت همزیست با گونه‌های معین ماهی و اسکوئید زندگی کند (۲۶). خاصیت لومینسانس در باکتری ویبریو فیشری به‌وسیله مکانیسم تنظیمی حساس به تراکم جمعیت موسوم به حد نصاب احساس کنترل می‌شود (۱). پدیده حد نصاب احساس مکانیسم ارتباط بین سلولی را توصیف می‌کند که توسط آن باکتری‌ها می‌توانند رفتار گروهی را مطابق با تراکم جمعیت تغییر دهند. این فرایند به سنتز و انتشار مولکول‌های سیگنال‌دهی، به‌نام خودالقاگرها (Autoinducers)، به محیط اطراف بستگی دارد. به محض رسیدن به غلظت آستانه خودالقاگرها واکنش‌های سلولی را با تغییر بیان ژن در کل جمعیت تحریک می‌کنند. حد نصاب احساس، طیف گسترده‌ای از فرایندها در باکتری‌ها شامل تولید

بیولومینسانس، اسپورزایی، تشکیل بیوفیلم و سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و فاکتورهای بیماری‌زایی را کنترل می‌کند (۲۰ و ۳۱).

باکتری ویبریو فیشری (ATCC Number 7744) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران در تهران به‌صورت کشت مایع موجود در محیط کشت باکتومارین براث تهیه شد. سلول‌های استوک در یک لیتر فتوباکتریوم براث استریل حاوی ۵ گرم کازئین هیدرولیزات آنزیمی ، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۳ گرم کلرید آمونیوم ، ۰/۳ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۱ گرم کلرید آهن، ۱ گرم کلسیم کربنات، ۳ گرم مونوپتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۲۳/۵ گرم سدیم گلیسروفسفات، ۳۰ گرم سدیم‌کلراید در یک لیتر آب مقطر رشد داده شدند. همچنین باکتری‌ها روی فتوباکتریوم آگار (سیگما، سوئیس) تلقیح و کشت داده شدند و در انکوباتور به ترتیب به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. پس از رشد باکتری‌ها، محیط کشت‌ها در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین یک سویه باکتری برای نگهداری در زمان طولانی‌تر، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در گلسیرول ۲۰٪ برای جلوگیری از تحلیل دیواره سلولی نگهداری شد (۲). لازم به ذکر است در همه آزمایش‌ها، محیط کشت‌ها قبل از تلقیح در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند.

بررسی الگوی رشد باکتری ویبریو فیشری

باکتری‌ها دائماً در حال تغییر، تولید مثل و تعامل با محیط خود هستند. در بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، کار با باکتری‌هایی که در مرحله حداکثر رشد هستند اغلب بسیار مفید است. جمعیت‌های باکتریایی دارای چهار مرحله رشد مشخص شامل فاز تاخیر، فاز نمایی، فاز سکون و فاز مرگ هستند. هر مرحله وضعیت متوسط سلامت سلول‌های فردی درون محیط کشت را منعکس می‌کند. به‌منظور بررسی رشد، باکتری در محیط کشت مایع فتوباکتریوم براث تلقیح شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در فواصل زمانی معین (ساعت‌های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۲۸، ۳۲ و ۴۸ ام) پس از تلقیح، مقدار جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Jasco v-530) اندازه‌گیری شد.

اثر عوامل محیطی بر رشد باکتری ویبریو فیشری

اثر pH

محیط کشت فتوباکتریوم براث در چهار مقدار مختلف pH از جمله ۳، ۵، ۷ و ۹ آماده شد. سپس مقدار پنج میلی‌لیتر از محیط کشت به درون لوله‌های آزمایش منتقل شد و باکتری‌ها تلقیح شدند. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار (۳۰۰ دور بر دقیقه) قرار گرفتند. تراکم سلولی باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

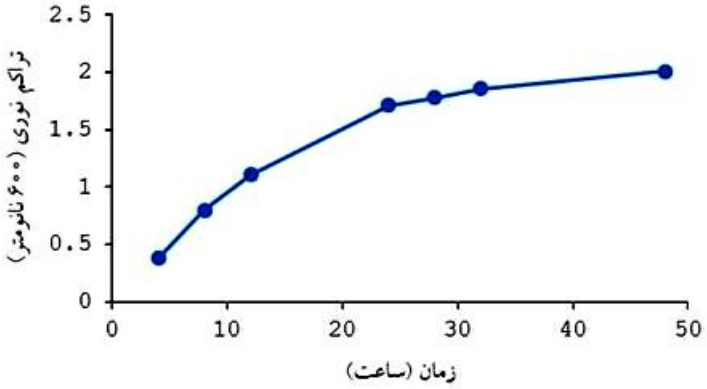
اثر دما

محیط کشت فتوباکتریوم براث با pH نهایی حدود ۷ که قسمت قبل بهینه بود، آماده شد. سپس مقدار پنج میلی‌لیتر از محیط کشت به درون لوله‌های آزمایش منتقل و باکتری‌ها تلقیح شدند. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۶ ساعت درون انکوباتور شیکردار در دماهای ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تراکم سلولی باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اثر هیدروکربن‌های نفتی

در پژوهش حاضر به‌منظور بررسی سنجش سمیت ترکیبات نفتی از دو روش استفاده شد. نفت خام مورد استفاده از شرکت پالایش نفت اصفهان تهیه شد.

روش اول: در این روش برای بررسی سنجش سمیت نفت خام، ابتدا بخش قابل حل نفت خام در آب به‌روش ذیل آماده شد: برای تهیه امولسیون نفت در آب، آب مقطر و نفت خام به‌ترتیب به‌عنوان فاز پیوسته و فاز پراکنده مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا ۱۰۰ گرم نفت خام به یک لیتر آب مقطر اضافه شد. همچنین ۶۰ میلی‌لیتر از ماده امولسیون کننده سدیم دودسیل سولفات ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) با غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر به مواد قبلی (درحالی



شکل ۱. منحنی رشد باکتری ویبریو فیشری در زمان‌های مختلف

که روی لرزاننده مغناطیسی ۸۰۰ دور بر دقیقه قرار داشت)، اضافه شد (۳۰). سپس امولسیون حاصل برای حدود ۱۰ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داخل تانک سونیکاتور قرار گرفت. پس از آن به‌مدت یک ساعت امولسیون در حالت سکون قرار گرفت تا از جداسازی نفت پراکنده نشده در آب اطمینان حاصل شود. پس از عبور دادن محلول ساخته شده از کاغذ صافی واتمن ۴۲، امولسیون حاصل از فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرومتر نیز عبور داده شد (۲۳).

غلظت‌های مختلف نفتی (۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد حجمی) در نسبت‌های مختلف محلول نفت و محیط کشت فتوباکتریوم براث تهیه شد. سپس باکتری ویبریو فیشری درون محلول‌های تهیه شده تلقیح و به‌مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. بعد از ۱۶ ساعت مقادیر رشد سلولی هر تیمار با اندازه‌گیری تراکم نوری به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. پس از آن مقدار شش میلی‌لیتر از هر تیمار درون پتری‌دیش استریل ریخته و برای آزمایش سنجش لومینسانس داخل دستگاه PMT (Hamamatsu R6094) قرار داده شد (۵). شدت لومینسانس باکتری با واحد تعداد فوتون بر ثانیه در مدت ۳۰۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

روش دوم: نفت خام به‌صورت یک لایه نفتی روی میزان مشخصی از محیط کشت استریل شده (۱۰ میلی‌لیتر) داخل تیوب های شیشه‌ای با غلظت‌های متفاوت (۲، ۵ و ۱۰ درصد حجمی) ریخته شد. سپس به‌میزان نفت ریخته شده، سدیم دودسیل سولفات (۲، ۵ و ۱۰ درصد حجمی) به‌عنوان سورفکتانت نیز به‌منظور حل کردن بخش قابل حل نفت خام اضافه شد. بعد از گرماگذاری به‌مدت ۱۶ ساعت، لایه نفتی به دقت جدا شد و ادامه مراحل طبق روش اول صورت گرفت. در این روش برای بررسی لومینسانس در دستگاه PMT، به‌منظور مقایسه همزمان دو تیمار شاهد (تیمار باکتری بدون حضور نفت در محیط) و تیمار حاوی نفت، ابتدا به‌مدت ۶۰ ثانیه لومینسانس شاهد قرائت شد و سپس به‌مدت ۲۴۰ ثانیه تیمار غلظت نفت مورد بررسی، اندازه‌گیری شد.

برای بررسی اختلاف میانگین میان غلظت‌های مورد بررسی از آزمون مقایسه میانگین Fisher's LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS V.22 استفاده شد.

نتایج و بحث

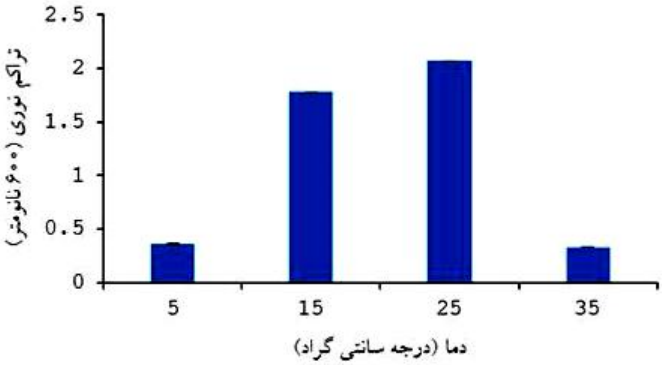
الگوی رشد باکتری

رشد ویبریو فیشری به‌عنوان تابعی از زمان تعیین شد. یک نوع رشد نمایی با گذشت زمان در منحنی رشد باکتری مشاهده می‌شود (شکل ۱). در ساعت‌های اولیه پس از تلقیح، رشد سرعت چندانی نداشت. در ساعت‌های ۱۲ تا ۲۴ باکتری در مرحله رشد نمایی قرار داشت و سپس به مرحله سکون نزدیک شد. ساعت ۱۶ ام که حدوداً نیمه فاز رشد لگاریتمی بود به‌عنوان زمان بهینه رشد باکتری درنظر گرفته شد که پویایی باکتری حفظ شود و به فاز سکون نرسیده باشد.

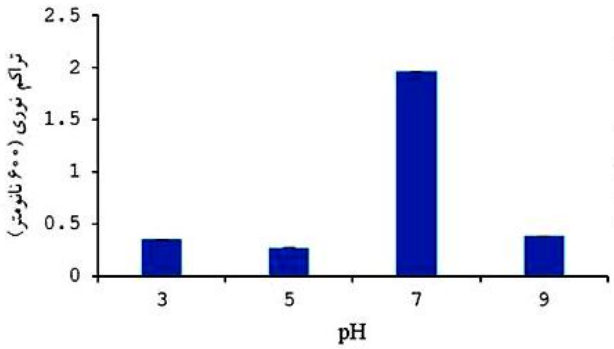
اثر عوامل محیطی بر رشد باکتری

اثر pH و دما

شرایط بهینه برای رشد ویبریو فیشری قبل از سنجش سمیت



شکل ۲. اثر pH بر رشد باکتری ویبریو فیشری (داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج ± انحراف معیار هستند).



شکل ۳. اثر دما بر رشد باکتری ویبریو فیشری (داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج ± انحراف معیار هستند).

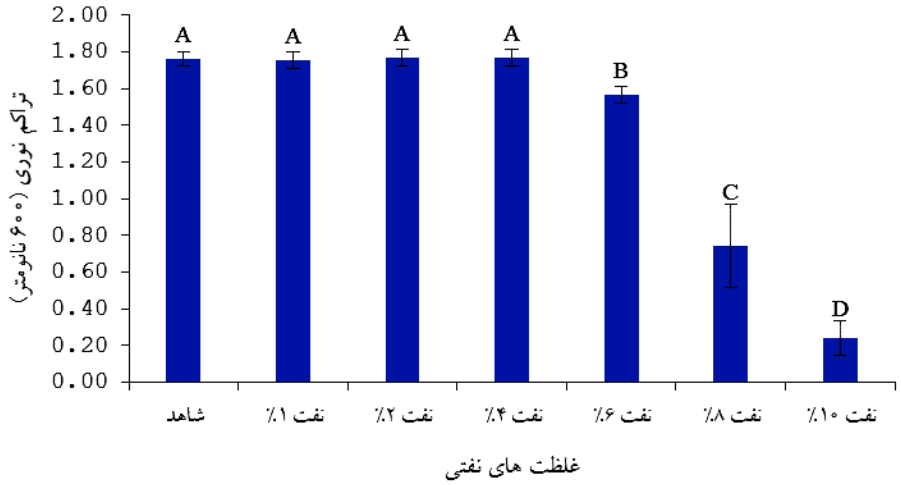
تعیین شد. در تمام pHها باکتری ویبریو فیشری قادر به رشد بود، ولی رشد بهینه و بیشینه در pH حدود ۷ رخ داد (شکل ۲). نتایج رشد در دماهای مختلف نیز همین روند را نشان داد با این تفاوت که رشد بهینه و بیشینه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد (شکل ۳). به این ترتیب pH ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی آزمایش درنظر گرفته شد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ توسط هنگدا و همکاران روی باکتری ویبریو فیشری جدا شده از نمونه‌های رسوب دریایی جزیره‌ای واقع در چین صورت گرفت، شرایط اساسی رشد و لومینسانس باکتری در کشت مایع 2216E تعیین شد که در آن pH ۷ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار نمک دو درصد بهترین شرایط رشد باکتری و pH ۶-۵ و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و نمک سه درصد شرایط بهینه لومینسنت بود (۱۳). در پژوهشی مشابه، لومینسانس پایدار باکتری *Photobacterium phosphoreum* در محدوده pH ۷ تا ۹ و دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و مقدار نمک ۲/۵ درصد مشاهده شد (۱۵). بیشتر باکتری‌های لومینسنت نیاز به مقادیر pH نزدیک به خنثی برای فعالیت‌های رشد و لومینسانس خود دارند (۶). برای مثال حداکثر میزان رشد و لومینسانس برای باکتری *P. phosphoreum* KCTC 2852 با استفاده از محیط کشت BOSS اصلاح شده، در pH ۷ و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (۱۱) و برای باکتری ویبریو فیشری در pH ۷/۵ و دمای حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت LBS گزارش شده است (۲۷).

اثر هیدروکربن‌های نفتی

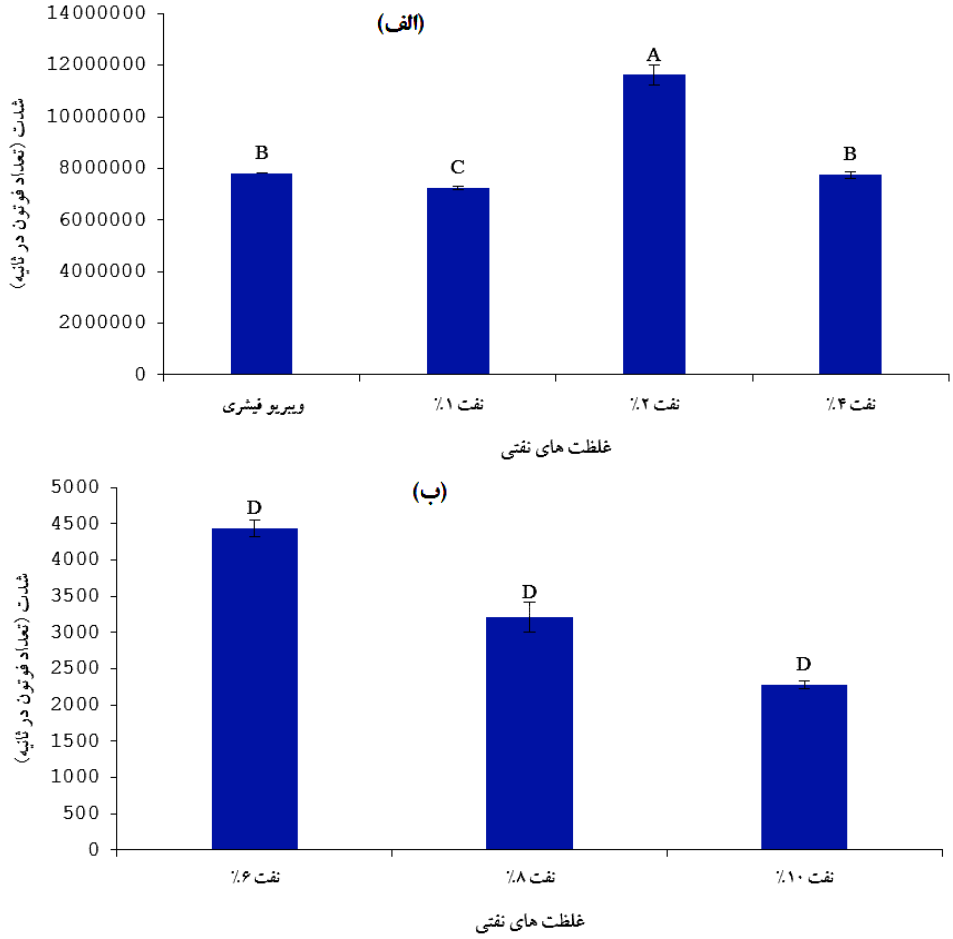
برای سنجش سمیت ترکیبات نفتی غلظت‌های مختلف از نفت در محیط کشت فتوباکتریوم براث تهیه شد و پس از تلقیح باکتری، رشد و لومینسانس باکتری اندازه‌گیری شد. در بررسی سنجش بلندمدت رشد و لومینسانس ویبریو فیشری بعد از ۱۶ ساعت اندازه‌گیری شد.

نتایج روش اول اختلاط نفت با محیط کشت نشان داد که در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ درصد کل هیدروکربن‌های نفتی، تفاوت قابل توجهی در رشد و تراکم سلولی ویبریو فیشری مشاهده نشد (شکل ۴). ولی با افزایش غلظت نفت، رشد باکتری کاهش پیدا کرد، به‌طوری که در غلظت ۱۰ درصد تراکم سلولی باکتری به زیر ۰/۵ رسید. درنتیجه غلظت‌های بیش از چهار درصد حجمی نفت در محیط آبی موجب ایجاد سمیت برای باکتری و کاهش رشد آن شده است.

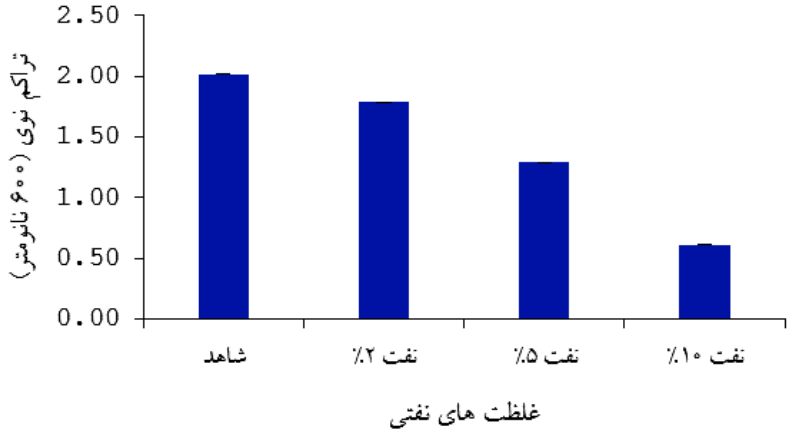
نتایج حاصل از بررسی نورتابی ویبریو فیشری در شکل ۵ -الف نشان می‌دهد که در غلظت‌های یک و چهار درصد مقادیر نورتابی تفاوت چندانی ندارد. ولی در غلظت دو درصد شدت نورتابی باکتری افزایش پیدا کرد. شاید علت این موضوع تمایل باکتری‌ها برای مصرف نفت در این غلظت بوده



شکل ۴. اثر غلظت‌های مختلف نفت خام محلول در محیط کشت (اختلاط داده شده) بر رشد باکتری ویبریو فیشری. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج ± انحراف معیار هستند (حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد میان گروه‌های مورد بررسی است).



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف نفت اضافه شده روی محیط کشت به‌صورت ستونی: الف) غلظت‌های ۰.۱، ۰.۲ و ۰.۴ درصد حجمی و ب) غلظت‌های ۰.۶، ۰.۸ و ۱۰ درصد حجمی بر شدت لومینسانس باکتری ویبریو فیشری. داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج ± انحراف معیار هستند (حروف یکسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد میان گروه‌های مورد بررسی است).

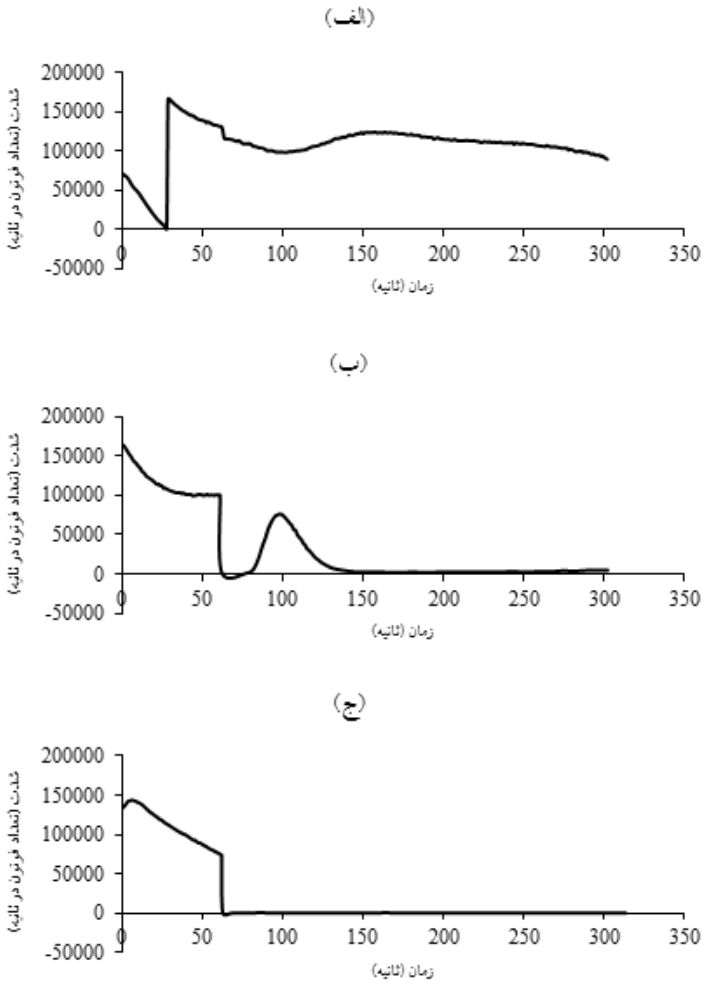


شکل ۶. اثر غلظت‌های مختلف نفت در محیط کشت به‌صورت ستونی بر رشد باکتری ویبریو فیشری (داده‌ها نمایانگر میانگین نتایج ± انحراف معیار هستند).

است و با افزایش غلظت میزان هیدروکربن موجود در محیط بیش از نیاز مصرفی باکتری بوده است. برای اطمینان از این موضوع بررسی پتانسیل تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری مورد مطالعه ضروری است. از طرف دیگر با افزایش غلظت نفت در غلظت‌های ۶، ۸ و ۱۰ درصد شدت لومینسانس کاهش شدیدی داشت (شکل ۵- ب) که بیانگر سمیت ترکیبات نفتی برای باکتری مورد مطالعه است و با نتایج رشد باکتری نیز همخوانی نشان می‌دهد.

نتایج روش دوم اضافه کردن نفت به محیط کشت حاکی از این بود که رشد باکتری وابسته به مقدار نفت محیط رشد است (شکل ۶). با افزایش غلظت نفت، رشد باکتری کاهش یافت که دلیل آن را می‌توان به سمیت نفت برای باکتری در غلظت‌های بالا نسبت داد. نتایج حاصل از بررسی لومینسانس نشان داد کاهش شدت لومینسانس ویبریو فیشری با افزایش غلظت نفت ارتباط مستقیم داشت (شکل ۷). شدت نورافشانی در ویبریو فیشری حدوداً ۱۶۰۰۰۰ فوتون در ثانیه بود اما شدت بیولومینسانس با افزایش غلظت نفت کاهش چشمگیری داشته به‌طوری که در غلظت ۱۰ درصد نفت به حدود صفر رسید. این کاهش چشمگیر بیولومینسانس را می‌توان به سمیت نفت و میزان اکسیژن دریافتی به باکتری نسبت داد. با افزایش ضخامت لایه نفتی میزان اکسیژن کمتری به باکتری رسیده و درنتیجه رشد و به‌تبع آن لومینسانس نیز کاهش می‌یابد. در پژوهشی ال- علوی و همکاران در سال ۲۰۰۲، روش اندازه‌گیری سمیت کوتاه‌مدت و بلندمدت ناشی از نور یک گروه مهم از آلاینده‌ها، یعنی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای، را با استفاده از باکتری‌های لومینسنت ویبریو فیشری توسعه دادند. آزمون‌های سمیت کوتاه‌مدت و بلندمدت با ۱۲ نوع ترکیب آروماتیک حلقوی مختلف انجام شد. سنجش کوتاه‌مدت بعد از ۱۵ دقیقه، سمیت ناشی از نور را برای هیچ‌یک از مواد شیمیایی مورد استفاده نشان نداده است که یکی از دلایل احتمالی آن عدم زمان کافی برای انجام واکنش‌های حساس به نور و یا تغییر در اثر نور می‌تواند باشد. با وجود این، سمیت ناشی از نور در سنجش بلندمدت بعد از ۱۸ ساعت ظهور پیدا کرده است. این نتایج ثابت کرد که سنجش‌های کوتاه‌مدت ممکن است برای این مکانیسم کلیدی سمیت ترکیبات آروماتیک حلقوی مبهم باشد (۴).

در پژوهشی نمونه‌های خاک آلوده به کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) از میدان نفتی چین جمع‌آوری شد و آنالیز سمیت بر اساس آزمون باکتری‌های لومینسنت انجام شد. غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک ۱۰/۵۷ درصد بود. مقدار غلظت نفت در خاک که باعث کاهش ۵۰ درصد لومینسانس شد برابر ۰/۴۷ درصد بود. نرخ مهار لومینسانس هنگامی که محتوای نفتی یک درصد بود، ۱۰۰ درصد گزارش شد که حاکی از سمیت بالای نفت روی فعالیت باکتری‌ها بود (۲۹). با توجه به اینکه تحقیق حاضر در محیط آبی



شکل ۷. تاثیر غلظت‌های مختلف نفت در محیط کشت به‌صورت ستونی (الف: ۲ درصد ، ج: ۱۰ درصد) بر شدت لومینسانس باکتری ویبریو فیشری

انجام شد، امکان مقایسه نتایج با محیط خاکی که قبلا اشاره شد وجود نداشت و متأسفانه در بررسی منابع موردی که در آن اثر سمیت نفت خام بر باکتری ویبریو فیشری در محیط آبی یافت نشد. با وجود این نتایج پژوهش بیانگر پتانسیل بالای باکتری ویبریو فیشری در محیط حاوی نفت با غلظت‌های بالاتر (بیش از چهار درصد حجمی نفت خام) بود.

یکی از روش‌های رایج مورد استفاده برای سنجش سمیت ترکیبات نفتی استفاده از دافنیا مگنا است. به‌عنوان مثال مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ روی سمیت نفت خام و مواد نفتی پالایش شده انجام گرفت نشان داد که در آزمون سمیت بلندمدت، بین طول دوره زندگی دافنیا مگنا و غلظت نفت خام فقط در غلظت‌های بالا ارتباط معنی‌دار وجود داشت و در غلظت‌های پایین نفت ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد (۲۵). بنابراین به‌نظر می‌رسد حساسیت روش استفاده از باکتری در این تحقیق مشابه نتایج تحقیق گفته شده در غلظت‌های کم نفت، پایین است.

نتیجه‌گیری

پایش زیستی با استفاده از باکتری‌های بیولومینسنت در سال‌های اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته و به‌دلیل مزایای فراوان از جمله به حداقل رساندن زمان شناسایی، افزایش

حساسیت و پاسخ‌های قابل مشاهده به‌طور گسترده در پایش سمیت زیست‌محیطی به‌کار برده شده است. در مطالعه حاضر از باکتری ویبریو فیشری برای پایش سمیت ترکیبات نفتی در محیط آبی استفاده شد. در ابتدا بهینه‌سازی شرایط کشت انجام شد که این امر به این دلیل ضروری است که کاربرد سنجش بیولومینسنت در نمونه‌های مختلف نیازمند یک سویه لومینسنت با حساسیت و پایداری بهتر در شرایط متفاوت سنجش است. نتایج آزمایشات pH ۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را به‌عنوان شرایط بهینه نشان داد.

از آنجا که نفت و فراورده‌های مشتق شده از آن احتمالاً پیچیده‌ترین و متغیرترین ترکیبات برای ارزیابی سمیت هستند و روش‌های شیمیایی نیز هیچ اطلاعاتی در مورد اثرات زیستی آلاینده‌ها ارائه نمی‌دهند زیست‌سنجی بیولومینسانس بسیار حائز اهمیت است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش سنجش سمیت بر اساس مهار بیولومینسانس باکتری ویبریو فیشری در غلظت‌های بیش از چهار درصد حجمی کل هیدروکربن‌های نفتی روشی با پتانسیل مناسب برای پایش سمیت آلاینده‌های نفتی در محیط آبی است ولی در غلظت‌های کم نفت در محیط حساسیت روش پایین است. قطعا روش‌های با حساسیت بیشتر و دقیق‌تر از این روش هم وجود دارد ولی در بحث کارایی روش، مواردی مانند گستره کاربرد روش و ملاحظات اقتصادی نیز دخیل هستند. در برخی موارد آلاینده‌ها ممکن است لزوماً بر تعداد سلول‌های باکتریایی اثرگذار نباشند و فعالیت باکتری‌ها بیشتر تحت تأثیر قرار گیرد. در چنین مواردی بررسی فعالیت باکتری‌ها از روش‌های مختلف مانند بررسی تغییرات آنزیمی و یا فعالیت‌هایی مانند نورافشانی می‌تواند کامل‌تر باشد. با وجود این، انجام مطالعات بیشتر در زمینه تأثیر ترکیبات نفتی مانند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای بر شدت بیولومینسانس باکتری مورد مطالعه و استفاده از روش‌های دقیق‌تر سنجش بیولومینسانس به‌ویژه در محیط‌های طبیعی توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Abbas, M., M. Adil, S. Ehtisham-ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, G. A. Shar, M. A. Tahir and M. Iqbal. 2018. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment* 626: 1295-1309.
2. Budsberg, K., C. Wimpee and J. Braddock. 2003. Isolation and identification of Photobacterium phosphoreum from an unexpected niche: migrating salmon. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6938-6942.
3. Das, N. and P. Chandran. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International* 2011: 1-13.
4. El-Alawi, Y. S., B. J. McConkey, D. G. Dixon and B. M. Greenberg. 2002. Measurement of short-and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51(1): 12-21.
5. Ellis, R. and A. Wright. 1999. Optimal use of photomultipliers for chemiluminescence and bioluminescence applications. *Luminescence* 14(1): 11-18.
6. Farmer, J. J. and F. W. Hickman-Brenner. 2006. The genera vibrio and photobacterium. PP. 508-563. *In*: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer and E. Stackebrandt, (Eds.), The Prokaryotes. Vol. 6. Springer, New York, NY.
7. Fernández-Piñas, F., I. Rodea-Palomares, F. Leganés, M. González-Pleiter and M. A. Muñoz-Martín. 2014. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. PP. 65-135. *In*: Thouand, G. and R. Marks (Eds.), Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 2. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol 145. Springer, Berlin, Heidelberg.
8. Girotti, S., L. Bolelli, A. Roda, G. Gentilomi and M. Musiani. 2002. Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta* 471(1): 113-120.
9. Girotti, S.; Ferri, E. N.; Fumo, M. G. & Maiolini, E. 2008. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta* 608(1): 2-29.
10. Goel, P. 2006. Water Pollution: Causes, Effects and Control. 2nd Edition. New Age International.
11. Hassan, S. H. and S. E. Oh. 2010. Improved detection of toxic chemicals by Photobacterium phosphoreum using modified Boss medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 101(1): 16-21.

12. Hassan, S. H., S. W. Van Ginkel, M. A. Hussein, R. Abskharon and S. -E. Oh. 2016. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment International* 92-93: 106-118.
13. Hongda, F., D. Yanhong, X. Zhanzhou, Y. Yin, L. Xiuqin and Y. Bin. 2008. Cultural and luminescent conditions of a marine luminous bacterium. *Marine Science Bulletin* 10(1): 1-8.
14. Kudryasheva, N., V. Kratasyuk, E. Esimbekova, E. Vetrova, E. Nemtseva and I. Kudinova. 1998. Development of bioluminescent bioindicators for analysis of environmental pollution. *Field Analytical Chemistry & Technology* 2(5): 277-280.
15. Kuts, V. and A. Ismailov. 2009. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium Photobacterium phosphoreum from the White Sea. *Microbiology* 78(5): 612-617.
16. Lim, T. -T. and X. Huang. 2007. Evaluation of kapok (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.) as a natural hollow hydrophobic–oleophilic fibrous sorbent for oil spill cleanup. *Chemosphere* 66(5): 955-963.
17. Martinez-Jeronimo, F., R. Villasenor, G. Rios and F. Espinosa-Chavez. 2005. Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on Daphnia magna (Crustacea: Anomopoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48(4): 444-449.
18. Medvedeva, S. E., N. A. Tyulkova, A. M. Kuznetsov and E. K. Rodicheva. 2009. Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria. *Journal of Siberian Federal University* 2: 418-452.
19. Megharaj, M., I. Singleton, N. McClure and R. Naidu. 2000. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38(4): 439-445.
20. Molina, A., R. Tuazon and L. Larman. 2015. Responses of Bioluminescent Bacteria Isolated from Philippine Marine Fishes to Various Heavy Metals. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 9(13): 38-42.
21. Parvez, S., C. Venkataraman and S. Mukherji. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 32(2): 265-268.
22. Potters, G. 2013. Marine Pollution. Bookboon.
23. Rajak, V., S. Kumar, N. Thombre and A. Mandal. 2018. Synthesis of activated charcoal from saw-dust and characterization for adsorptive separation of oil from oil-in-water emulsion. *Chemical Engineering Communications* 205(7): 897-913.
24. Ranjan, R., N. K. Rastogi and M. Thakur. 2012. Development of immobilized biophotonic beads consisting of Photobacterium leiognathi for the detection of heavy metals and pesticide. *Journal of Hazardous Materials* 225: 114-123.
25. Ratushnyak, A. A., M. G. Andreeva, V. Z. Latypova, R. R. Shagidullin and M. V. Trushin. 2009. Toxicity of oil and products of its refinement to Daphnia magna: time and temperature dependences. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 5(4): 545-549.
26. Scheerer, S., F. Gomez and D. Lloyd. 2006. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods* 67(2): 321-329.
27. Soto, W., J. Gutierrez, M. Remmenga and M. K. Nishiguchi. 2009. Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microbial Ecology* 57(1): 140-150.
28. Szczerbiñska, N., and M. Gałczyñska. 2015. Biological methods used to assess surface water quality. *Archives of Polish Fisheries* 23(4): 185-196.
29. Tang, J., M. Wang, F. Wang, Q. Sun and Q. Zhou. 2011. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 23(5): 845-851.
30. Tony, M. A., P. J. Purcell, Y. Zhao, A. M. Tayeb and M. El-Sherbiny. 2009. Photo-catalytic degradation of an oil-water emulsion using the photo-fenton treatment process: effects and statistical optimization. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 44(2): 179-187.
31. Verma, S. C. and T. Miyashiro. 2013. Quorum sensing in the squid-Vibrio symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences* 14(8): 16386-16401.

Journal of Water and Soil Science
Vol. 24, Spring 2020, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

An Investigation of the Potential of *Vibrio fischeri* Bacterium for Monitoring of Oil Pollution in Aqueous Media

M. Mirjani[1], M. Soleimani[1*] and V. Salari[2]

(Received: April 9-2019; Accepted: June 22-2019)

Abstract

Growing concerns about water pollution and its potentially harmful effects on human being have stimulated serious efforts to develop reliable biological monitoring techniques. The bioluminescent analysis is one of the most promising approaches for the biomonitoring of the environment, due to the sensitivity of the luminescent system to even micro quantities of the pollutants. The aim of the current study was to assess the petroleum compounds toxicity using *Vibrio fischeri* bacterium. The growth pattern of the bacterium was determined in photobacterium broth using the optical density measurement at 600 nm, which showed the optimum growth time of 16-18 hours after inoculation. In this research, the effects of environmental parameters such as temperature, pH and various concentrations of oil on the growth and luminescence of *Vibrio fischeri* were examined. The results revealed that the optimum growth conditions of the bacterium after 16 hours included the temperature of 25 °C and pH 7. Besides, the growth and luminescence intensity of *Vibrio fischeri* were a function of total petroleum hydrocarbon concentrations in the medium, which were significantly reduced in oil concentrations by more than 4% w/v. Therefore, the *Vibrio fischeri* could, have the potential for monitoring of petroleum pollutants in the aqueous media.

Keywords: *Vibrio fischeri*, Biomonitoring, Bioluminescent bacteria, Petroleum pollutants, Water pollution.

1- Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2- Faculty of Physics, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
*: Corresponding author, Email: m.soleimani@iut.ac.ir