



جداسازی، غربالگری و کارایی جدایه‌های سودوموناس در تشکیل بیوفیلم بر حامل‌های آلی و معدنی و تجزیه فنانترن

مریم ترکاشوند^۱، امیر لکزیان^{۲*}، امیر فتوت^۱، مهدی محمدی^۳

^۱ دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک، مشهد، ایران، ^۲ استاد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک، مشهد، ایران، ^۳ دانشیار، دانشگاه خلیج فارس، پژوهشکده خلیج فارس، گروه زیست فناوری، بوشهر، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیوفیلم‌های میکروبی یکی از مهمترین فرم‌های حیات میکروارگانیسم‌ها در محیط هستند. هدف از این پژوهش استفاده از بیوفیلم باکتری سودوموناس بومی خاک‌های ایران به منظور تجزیه فنانترن بود.

مواد و روش‌ها: از بین ۶۳ سودوموناس جدا شده از خاک، جدایه باکتریایی با توان بالا در تولید بیوفیلم و تجزیه نفت خام انتخاب و شناسایی شد. سپس تاثیر حامل‌های معدنی (پومیس خام، پومیس فرآوری شده و پرلیت) و آلی (بیوجار و باگاس) بر تولید بیوفیلم میکروبی بررسی شد و ساختار بیوفیلم‌ها بوسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید. همچنین تاثیر تیمارهای باکتری سودوموناس *آتروجینوزا* در دو فرم رشدی پلانکتونی و بیوفیلم بر روی حامل بیوجار بر تولید آنزیم لاکاز و تجزیه فنانترن در محیط مایع بررسی شد.

یافته‌ها: جدایه‌های خالص سازی شده از نظر تولید بیوفیلم و توان تجزیه نفت خام غربالگری شدند. جدایه B59 (سودوموناس *آتروجینوزا*) با ۶۲/۵۶٪ بیشترین درصد تجزیه نفت خام را نشان داد. بیشترین میزان لگاریتم واحد تشکیل کلنی مربوط به بیوفیلم تشکیل شده بر حامل بیوجار و برابر ۸/۸ و کمترین در حامل پومیس فرآوری شده و برابر ۲/۹ بود. میزان فعالیت آنزیم لاکاز در فرم بیوفیلمی ۳۹/۸ و در فرم پلانکتونی ۳۳/۱ واحد در دقیقه بود. همچنین فرم بیوفیلمی و پلانکتونی به ترتیب موجب تجزیه ۹۷/۱۷٪ و ۹۱/۳۷٪ از فنانترون موجود در محیط شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که فرم بیوفیلمی باکتری در مقایسه با فرم پلانکتونی از طریق افزایش معنی دار واحد تشکیل کلنی و تولید بیشتر آنزیم لاکاز، موجب تجزیه بیشتر فنانترون در محیط مایع می‌گردد.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، سودوموناس *آتروجینوزا*، فنانترن، بیوجار، لاکاز.

دریافت مقاله: آذرماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۹۸

مقدمه

سطح چسبیده‌اند. سلول‌های باکتریایی، جلبکی، قارچی یا پروتوزوئرها قادر به تولید بیوفیلم می‌باشند (۱). تحقیقات نشان داده‌اند که بیوفیلم در مقایسه با شکل پلانکتونی، فرم غالب میکروارگانیسم‌ها به حساب می‌آید (۲). تاکنون تحقیقات در مورد بیوفیلم غالباً در زمینه سلامت، پزشکی و

بیوفیلم یا زیست لایه میکروبی به اجتماعی از سلول‌های ریزجانداران اطلاق می‌شود که غالباً در یک ماتریس خود تولید شده از مواد پلی مری خارج سلولی به یکدیگر و یا به یک

(* آدرس برای مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

پست الکترونیک: Lakzian@um.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۵۱۱۳۵۶۱۷

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>) در

فصلنامه دنیای میکروباها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.



شده است. در درجه اول، غیرمتحرک شدن طبیعی سلول‌های میکروبی در مواد پلی مری خارج سلولی ساخته شده توسط خود این سلول‌های میکروبی در بیوفیلم‌ها این روش را برای استفاده در فرایندهای زیستی بسیار اقتصادی و مقرون به صرفه کرده است. نکته دیگر اینکه بیوفیلم‌ها، در مقایسه با سلول‌های پلانکتونی، عموماً تحمل بیشتری در برابر ترکیبات سمی از خود نشان می‌دهند (۱۳). در واقع پایداری میکروبی در مقابل ترکیبات سمی یکی از مهمترین ویژگی‌های مورد نظر به منظور انتخاب میکروارگانیسم‌های مناسب برای عملیات زیست‌پالایی است (۱۴). در مطالعات مختلف گزارش شده است که سویه‌های مقاوم باکتری‌ها توانایی تجزیه هیدروکربن‌های چند آروماتیکی (Poly Aromatic Hydrocarbons=PAHs) را در خاک‌های آلوده را دارند (۱۶-۱۴). پژوهش حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های سودوموناس دارای توانایی تجزیه نفت خام و تولید بیوفیلم از خاک‌های آلوده به منابع هیدروکربنی و بررسی امکان تولید بیوفیلم بر حامل‌های مختلف آلی و معدنی در دو فرم پلانکتونی و بیوفیلمی و ارزیابی تولید آنزیم لاکاز و تجزیه فناترن توسط جدایه‌های منتخب انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی، غربالگری، و شناسایی فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی: به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس، دو نمونه خاک آلوده از اطراف منابع ذخیره گازوییل در شهرستان بهشهر (به مختصات جغرافیایی ۳۶/۷۲ درجه شمالی و ۵۳/۶۲ درجه شرقی) جمع‌آوری شدند و ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی آن‌ها مطابق روش‌های مرسوم آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (جدول ۱). سپس از سوسپانسیون خاک سری رقت تهیه و برای جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت اختصاصی کینگ بی (King B) (شرکت مرک کشور آلمان) استفاده شد. جدایه‌ها به مدت ۳۰-۴۸ ساعت در محیط کشت کینگ بی و در ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. تک کلنی‌ها بر اساس ویژگی ریخت‌شناسی شکل کلنی (کلنی‌های گرد، دارای لبه‌های صاف، ۲-۳ میلی‌متر قطر با سطح مات، ساختمان داخلی

صنعت متمرکز بوده است. به جرات می‌توان گفت که نگاه عمده و اصلی در این پژوهش‌ها، یافتن رهیافت‌هایی موثر و کارآمد به منظور حذف بیوفیلم‌های میکروبی به ویژه در صنایع غذایی و پزشکی می‌باشد (۳). با این وجود در سال‌های اخیر استفاده از بیوفیلم‌ها در صنایع و علوم محیطی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پایداری و تحمل در برابر تنش‌های محیطی، انتقال افقی ژن، سازگاری با محیط و توان رقابت بالا با میکروارگانیسم‌های بومی از دلایل مهم استفاده از بیوفیلم‌ها در علوم محیطی است (۴). از طرفی در محیط‌های آلوده به آلاینده‌های آلی بیوفیلم‌های میکروبی با تولید سورفاکتانت‌ها و افزایش حلالیت آلاینده‌ها موجب تجزیه سریع‌تر آلاینده در فضای نزدیک به میکروفلور می‌شوند (۵). در دهه‌های اخیر، توجه به سمت تجزیه آلاینده‌های نفتی به کمک روش‌های زیستی معطوف شده است. در این روش‌ها از موجودات زنده برای حذف یا سم زدایی آلاینده‌های زیست‌محیطی استفاده می‌کنند. برای اصلاح آلودگی‌های نفتی و هیدروکربنی، زیست‌پالایی یک فناوری کارآمد، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست است چرا که از توانمندی و فعالیت زیست‌تخریبی ریزجانداران بهره می‌برد (۸-۶). به طوری که اخیراً، بهره‌گیری از بیوفیلم‌های باکتریایی در پروتکل‌های زیست‌پالایی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است (۹ و ۱۰). به عنوان نمونه، ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که بیوفیلم ایجاد شده توسط دو سویه میکروکوکوس (*Micrococcus*) باعث افزایش قابل توجه تجزیه پلی‌آروماتیک‌های هیدروکربنی در مقایسه با باکتری‌های پلانکتونی می‌گردد (۱۱). کوئیت (Khoieit) و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند دو سویه بورخولدیریا فونگوروم (*Burkholderia fungorum*) در فرم بیوفیلمی در مقایسه با فرم پلانکتونی پایداری بیشتری نسبت به غلظت‌های بالای هیدروکربن‌ها دارند. محققین یاد شده امکان رشد و تعداد سلول‌های بیشتری از این باکتری‌ها را در غلظت بالاتر هیدروکربن‌ها را در حالت رشدی بیوفیلمی گزارش نمودند (۱۲). در حقیقت، مزایای بسیاری برای استفاده از بیوفیلم‌ها در مقایسه با سلول‌های پلانکتونی شناخته و گزارش

شیکر با ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند. پس از ۱۰ روز مقدار رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری و شمارش واحد تشکیل کلنی ارزیابی شدند. مقدار هیدروکربن باقی‌مانده با استفاده از حلال تولوئن عصاره‌گیری و از طریق جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف نفت خام در تولوئن رسم شد (۱۸).
(د) شناسایی مولکولی: پس از انجام آزمون‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه در نهایت یک جدایه (B59) که دارای توان قابل توجه در تولید بیوفیلم، مقدار رشد بیشتر در حضور نفت و همچنین توانایی تجزیه بالاتر در تجزیه نفت بود برای ادامه کار انتخاب شد. برای شناسایی مولکولی از روش 16S rRNA استفاده شد. بدین منظور DNA کل باکتری استخراج و طبق روش اصلاح شده مارمور و با استفاده از دو پرایمر عمومی (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') و (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') 1492R واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (۱۹). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دست آمده برای بررسی الگوی بانندی و ارزیابی نتایج، در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. برای این منظور و تعیین توالی قطعات تکثیر شده، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز درون چاهک‌های ژل آگارز یک درصد قرار داده شد و پس از استخراج باند مورد نظر از ژل به روش سامبورک و همکاران (۲۰۰۱) برای تعیین توالی دوطرفه با استفاده از BigDye terminator دستگاه Sequencer مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های به دست آمده پس از مشاهده با استفاده از نرم افزار Chromas 2.1 اصلاح و مورد تایید قرار گرفت. این توالی‌ها با استفاده از نرم افزار ClustaW هم‌ردیف‌سازی و به وسیله نرم افزار Bioedit 7.0.9 به فرمت‌های قابل استفاده تبدیل شد. توالی نوکلئوتیدی محصول PCR با توالی نوکلئوتیدهای موجود در GenBank مقایسه شد و درخت فیلوژنیک به روش Neighbor Joining با استفاده از نرم افزار Mega 5 رسم شدند.
(ه) تهیه بیوفیلم‌های باکتریایی روی حامل‌های آلی و معدنی: در

برجسته و قوام کره‌ای) خالص‌سازی گردید و سپس با پرتو افشانی لامپ UV ارزیابی گردید. کلنی‌های باکتریایی دارای ویژگی فلورسنت برای ادامه آزمون انتخاب شدند. جدایه‌های نهایی خالص‌سازی شده در محیط‌های شیب‌دار حاوی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) (شرکت مرک کشور آلمان) کشت داده شد و در چهار درجه سلسیوس برای استفاده‌های بعدی نگه‌داری شدند. در این مرحله در مجموع ۶۳ جدایه جداسازی و خالص‌سازی شدند. (ب) بررسی توان تولید بیوفیلم جدایه‌ها: توان تولید بیوفیلم تمامی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از روش میکروتیتر پلیت بررسی شد (۱۷). در این روش کشت ۲۴ ساعته هر جدایه به نسبت ۱:۱۰۰ در محیط کشت تازه رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این کشت رقیق شده به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس پلیت‌ها با محلول ۰/۱ درصد کریستال ویوله در آب رنگ آمیزی شدند و با اسید استیک شسته شدند. میزان تولید بیوفیلم با قرائت مقدار جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و در پایان چهار جدایه دارای بیشترین مقدار تولید بیوفیلم انتخاب شدند. (ج) بررسی توان تجزیه نفت خام: جدایه‌های انتخاب شده از آزمون قبل از نظر توان رشد در محیط آلوده و همچنین توانمندی در تجزیه نفت خام مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۸). از آنجا که نفت خام یک ترکیب مشتمل بر انواع مختلف ترکیبات آلکان، آلکن، هیدروکربن‌های آروماتیک و غیره می‌باشد. در مرحله انتخاب اولیه به منظور اطمینان از انتخاب باکتری که دارای توانمندی در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی، از آزمون تجزیه نفت خام استفاده شد. این مرحله در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمون شامل چهار جدایه انتخاب شده و دو سطح نفت خام بودند. برای این منظور جدایه‌های باکتریایی با OD₆₀₀ برابر یک به محیط کشت حاوی صفر و ۲ درصد نفت خام اضافه شدند. سپس ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی

ادامه نمونه‌ها توسط دستگاه spotter coater مدل SC7620 توسط طلا-پالادیوم (Au-Pd) به مدت ۱۸۰ ثانیه پوشش دهی شدند. این نمونه‌ها سپس توسط دستگاه SEM مدل ۱۴۵۰ VpLEO ساخت آلمان با قدرت تفکیک ۲۵ نانومتر با حداکثر ولتاژ کاری ۳۵ کیلوولت تحت ولتاژ ۲۰ کیلوولت در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفتند (۲۱).

(ز) تجزیه زیستی فنانترین: در مرحله نهایی زیست پالایی فنانترین با فرم پلانکتونی و بیوفیلمی باکتری منتخب از مراحل قبل (سودوموناس آئروجینوزا) مورد بررسی قرار گرفت. در این بخش به منظور اندازه‌گیری دقیق توان تجزیه زیستی از فنانترین که یک ترکیبی هیدروکربنی سه حلقه‌ای است استفاده شد. در مطالعات مختلف از این ترکیب به عنوان نماینده ترکیبات هیدروکربنی استفاده می‌شود، چرا که نتایج حاصل از تجزیه این ترکیب قابل تعمیم به سایر ترکیبات هیدروکربنی حتی با تعداد حلقه بیشتر نیز می‌باشد (۲۲-۲۴). برای این منظور آزمون در قالب طرح کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمون شامل سه سطح فرم رشدی (شاهد، پلانکتونی و بیوفیلمی) و دو سطح غلظتی آلاینده فنانترین (صفر و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) در سه زمان (۷، ۱۴ و ۲۱ روز) بودند. در هر زمان میزان فعالیت آنزیم لاکاز (۲۵)، میزان رشد باکتری (واحد تشکیل کلنی) و مقدار باقیمانده فنانترین اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکاز نمونه آنزیمی ابتدا به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. تغییر رنگ در مخلوط آنزیمی نشان از فعالیت آنزیم در محیط و اکسیداسیون ABTS ((2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) است. با اندازه‌گیری میزان جذب در زمان صفر و ده دقیقه در ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان فعالیت آنزیم لاکاز محاسبه شد. یک واحد آنزیمی برابر مقدار لاکازی است که یک میکرومول از ABTS را در یک دقیقه اکسید می‌کند. مقدار باقی مانده فنانترین با استفاده از روش EPA1654 توسط دستگاه HPLC مدل Agilent 1260 اندازه‌گیری شد

این مرحله طرح آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل سه حامل معدنی (پومیس خام و فراوری شده و پرلیت درشت دانه) و دو حامل آلی (باگاس نیشکر و بیوچار) بودند. به منظور تهیه بیوفیلم باکتریایی ابتدا حامل‌ها در دامنه اندازه ۱-۰/۸ سانتی متر انتخاب، دو مرتبه با آب مقطر جوشیده شسته و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و در دمای اتاق نگه‌داری شدند. پیش از انجام آزمون حامل‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر استریل شد و سپس مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی از کشت تازه جدایه مورد نظر با OD₆₀₀ برابر ۱ در بافر فسفات استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه نمکی با ۵ گرم از حامل‌های سترون شده با ۵ میلی لیتر جدایه باکتریایی تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر دورانی گرماگذاری شدند (۲۰). حامل‌های تلقیح شده با زادمایه باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. با هدف بررسی تولید بیوفیلم‌های باکتریایی حامل‌ها پیش و پس از مایه زنی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفتند. با هدف بررسی زنده‌مانی باکتری بر روی هر یک از حامل‌ها، هر حامل در حجم مشخصی بافر فسفات به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و نمونه تهیه شده روی محیط کشت اختصاصی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری و تا زمان ظهور کلنی‌ها نگه‌داری شد. همچنین به منظور برآورد میزان رشد باکتری در بیوفیلم‌های تک‌گونه‌ای واحد تشکیل کلنی باکتری (CFU) اندازه‌گیری شد. (و) عکس برداری با میکروسکوپ الکترونیکی روبشی: در مرحله آماده‌سازی بیولوژیک ابتدا تمامی نمونه‌ها در محلول گلو تار آلدئید ۲/۵٪ به مدت ۲ ساعت تثبیت شدند. نمونه‌ها سپس با محلول فسفات بافر نمکی ۳ بار شسته شدند. سپس مرحله آب‌گیری با الکل و با استفاده از اتانول با درصدهای ۳۵، ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دسیکاتور قرار داده شدند. در

جدول ۱: برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد آزمایش.

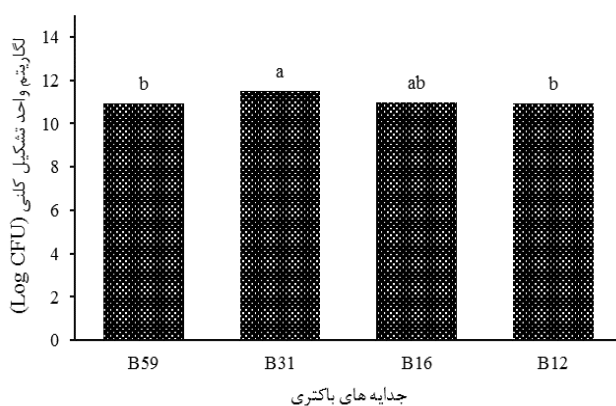
نمونه خاک	شن درصد	سیلت درصد	رس درصد	pH	نیترژن کل درصد	کربن آلی درصد	قابلیت هدایت الکتریکی dS.m ⁻¹	فسفر قابل دسترس mg. kg ⁻¹
۱	۵۳	۴۱/۹	۵۲/۸	۶/۷	۰/۱۷	۱/۹	۳/۳	۸۱/۱
۲	۴/۵	۳۹/۸	۵۵/۷	۶/۶	۰/۱۵	۱/۸۷	۳/۱	۷۹/۷

و برای انجام آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه، رشد و توان تجزیه نفت خام چهار جدایه انتخاب شده در محیط پایه معدنی آلوده شده به دو درصد نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که چهار جدایه مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر میزان تجزیه نفت خام داشتند. بر این اساس بیشترین میزان حذف نفت خام مربوط به جدایه B59 بود که توانست ۵۵/۳۵٪ از نفت خام را تجزیه کند. جدایه‌های B16، B31 و B12 به ترتیب با ۳۴/۷، ۱۶/۳۷ و ۱۳/۷۸ درصد تجزیه در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۱). لگاریتم واحد تشکیل کلنی در جدایه‌های B16، B31، B12 و B59 پس از یک دوره آزمایشی ده روزه برابر ۱۱/۱۵، ۱۱، ۱۰/۹۴، ۱۰/۹۲ بود. طبق این نتایج جدایه B31 بیشترین و جدایه B59 کمترین میزان رشد را نشان دادند. نتایج حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین جدایه‌های B16، B12 و B59 بود (شکل ۲). در انتهای این مرحله به دلیل اهمیت توان تجزیه نفت خام در انتخاب باکتری برای مراحل بعدی آزمون جدایه B59 انتخاب و مورد شناسایی ژنتیکی قرار گرفت. نتایج حاصل از

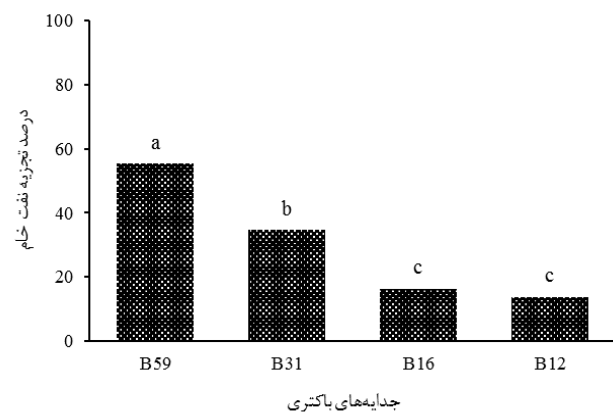
(۲۶). به منظور بررسی اثر فتواکسیداسیون نمونه شاهد بدون حضور باکتری و آلوده به ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن آماده‌سازی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری JMP و مقایسه میانگین‌ها نیز به روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

باکتری‌های سودوموناس از نمونه خاک‌های شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند (جدول ۱). از دو نمونه خاک جمعاً ۶۳ جدایه باکتری سودوموناس جداسازی شدند. ۵۸ و ۴۲ درصد جدایه‌ها به ترتیب از خاک شماره ۱ و ۲ جداسازی شدند. نتایج حاصل از بررسی توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های سودوموناس مورد مطالعه نشان داد تمام جدایه‌ها توانایی رشد و تولید بیوفیلم را دارا بودند. مقدار تولید بیوفیلم در ۲۴ ساعت به عنوان شاخص انتخاب توانمندترین جدایه در این آزمون مورد استفاده قرار گرفت. در بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های B12، B16، B31 و B59 بیشترین میزان تولید بیوفیلم را داشتند

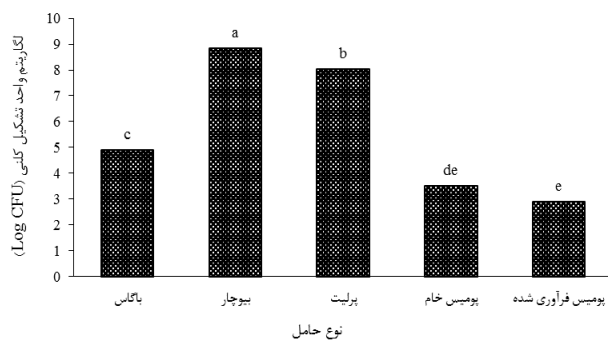


شکل ۲: مقایسه میانگین لگاریتم واحد تشکیل کلنی چهار جدایه انتخابی سودوموناس (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند).



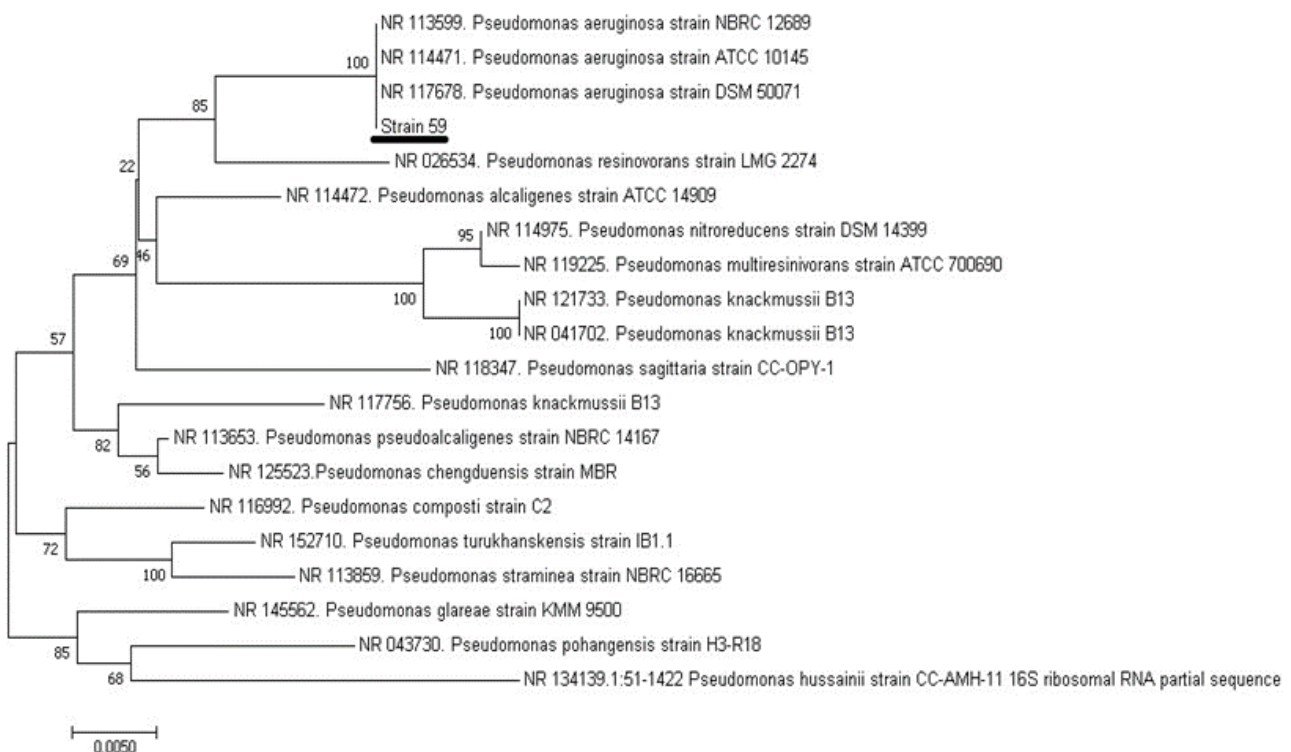
شکل ۱: مقایسه میانگین درصد تجزیه نفت چهار جدایه انتخابی سودوموناس (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری (p<0.05) ندارند).

عکس برداری از سطح حامل‌های آلی و معدنی پیش از تلقیح باکتریایی و پس از تشکیل بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروجینوزا توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام گرفت (شکل ۵). سطح حامل‌ها قبل از تلقیح نشان می‌دهد که حامل‌ها از نظر صافی و زبری، سطح در دسترس، خلل و فرج با یکدیگر تفاوت دارند. سطح بیوچار و باگاس نیشکر به دلیل داشتن منشا گیاهی شباهت ساختاری قابل توجهی با هم داشتند



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر ساده حامل‌های آلی و معدنی بر واحد تشکیل کلنی باکتری سودوموناس آئروجینوزا (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند).

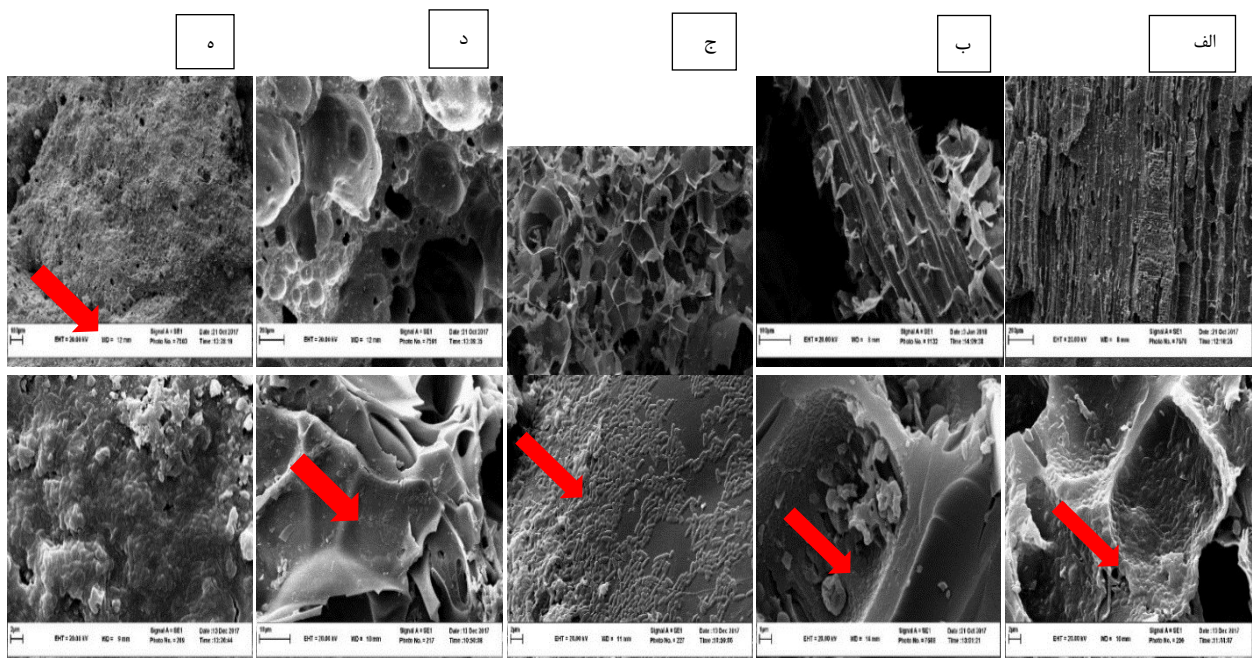
توالی یابی ژن 16S rRNA نشان داد سویه باکتریایی مورد نظر با ۱۳۸۲ نوکلئوتید به میزان ۹۹/۹۶ درصد با سویه *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962 (T) قرابت فیلوژنتیکی دارد (شکل ۳). در این مرحله تاثیر حامل‌های معدنی و آلی بر رشد و تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا (جدایه B59) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای آزمایش بر رشد باکتری‌ها نشان داد که حامل بیوچار با لگاریتم واحد تشکیل کلنی برابر با ۸/۸ بیشترین تعداد باکتری سودوموناس آئروجینوزا را دارا بود و به دنبال آن حامل‌های پرلیت، باگاس نیشکر، پومیس خام و پومیس فرآوری شده با لگاریتم واحد تشکیل کلنی برابر با ۴/۹، ۳/۵ و ۲/۹ به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۴). حامل‌های پومیس فرآوری شده و پومیس خام در عین حال که تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد باکتری نشان ندادند، اما تعداد باکتری روی حامل‌ها در مقایسه با حامل بیوچار بسیار کم بود. بررسی تعداد سلول‌های باکتریایی زنده در آزمون تشکیل کلنی نشان دهنده حضور سلول‌های باکتریایی بر سطح حامل‌ها بود.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی جدایه B59 (سودوموناس آئروجینوزا) با استفاده از روش Neighbor Joining و ضریب Boot Strap ۱۰۰.

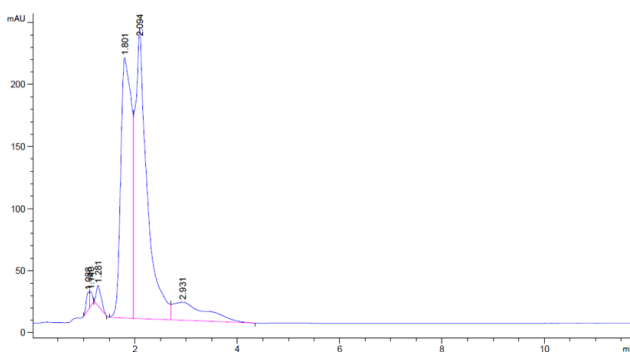
که اثرات ساده و متقابل تیمارهای آزمایش بر فعالیت آنزیم لاکاز و غلظت باقی مانده فنانترون در محیط کشت در سطح ۱ درصد معنی دار است، اما اثر سه گانه تیمارهای مورد بررسی بر میزان لگاریتم واحد تشکیل کلنی در سطح ۵ درصد معنی دار بود. بررسی نتایج اثر سه گانه تیمارهای آزمایش بر لگاریتم واحد تشکیل کلنی باکتری نشان داد در هر دو فرم پلانکتونی و بیوفیلمی و در تمام زمان‌های مورد بررسی (به استثنای فرم بیوفیلمی در روز ۲۱) با افزایش سطح آلاینده از صفر به ۵۰۰ میلی گرم فنانترون بر لیتر لگاریتم واحد تشکیل کلنی به طور معنی داری کاهش یافت. این کاهش در فرم پلانکتونی به طور معنی داری بیشتر از فرم بیوفیلمی بود. به عنوان نمونه در روز ۲۱، لگاریتم واحد تشکیل کلنی در فرم پلانکتونی با افزایش سطح آلودگی از صفر به ۵۰۰ میلی گرم فنانترون در لیتر ۰.۵۴٪ کاهش یافت، اما این کاهش برای فرم بیوفیلمی تنها ۰.۳٪ بود. در سطح صفر آلودگی با گذشت زمان انکوباسیون تعداد سلول‌های باکتری در هر دو فرم بیوفیلمی و پلانکتونی افزایش معنی داری داشت. در حالی که در سطح ۵۰۰ میلی گرم فنانترون

(شکل ۵ الف، ب، ج). حامل‌های انتخاب شده همگی دارای میزان قابل توجهی خلل و فرج بودند، تنها حامل پومیس فراوری شده (که با نام تجاری پوکه معدنی در دسترس است) نسبت به پومیس تازه استخراج شده از معادن دارای تفاوت بوده چرا که در مراحل مختلف خرد و گرانوله شدن سطح آن مورد ساییدگی قرار می‌گیرد (شکل ۵ د، ه). عکس‌های میکروسکوپی تهیه شده از بیوفیلم باکتری سودوموناس *آئروجینوزا* حضور سلول‌های باکتری با تراکم زیاد بر سطح حامل را نشان داد (شکل ۵). غیرمتحرک ماندن سلول‌ها و چسبندگی به سطح حامل به طور طبیعی علاوه بر این که یک روش غیرمتحرک‌سازی مقرون به صرفه و کارآمد است، به دلیل اینکه سلول‌ها در سیمانی از پلی ساکاریدهای خارج سلولی مستحکم شده‌اند، امکان شسته شدن سلول‌ها و یا در معرض تنش‌های مکانیکی و برشی قرار گرفتن به حداقل می‌رسد. نتایج تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای آزمون بر فعالیت آنزیم لاکاز، لگاریتم واحد تشکیل کلنی و غلظت باقی مانده فنانترون در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد

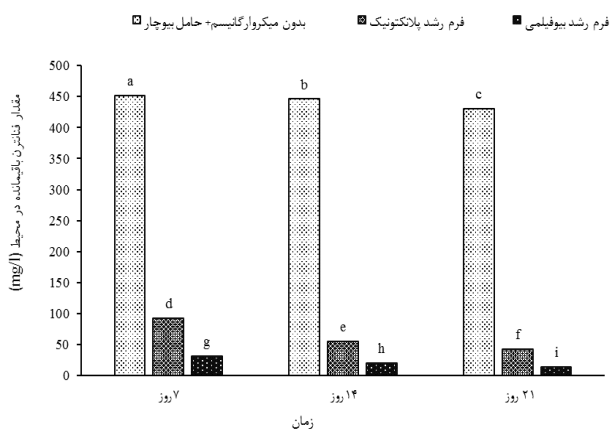


شکل ۵: تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی از حامل‌های آلی و معدنی: ردیف اول حامل‌ها پیش از تلقیح میکروبی، ردیف دوم بیوفیلم باکتریایی روی حامل‌های (الف) بیوجار، (ب) باگاس نیشکر، (ج) پرلیت، (د) پومیس خام و (ه) پومیس فراوری شده (بزرگ‌نمایی در تصاویر حامل‌های عکسبرداری شده پیش از تلقیح ۲۰۰ میکرومتر و در بیوفیلم‌ها ۲ میکرومتر می‌باشد).

باکتری سودوموناس آئروجینوزا بر حامل بیوجار پس از هفت روز ۹۳/۷۵ درصد از فنانترن موجود در محیط را حذف نمود (شکل ۶)، اما باکتری در فرم رشدی پلانکتونی ۸۱/۵ درصد آلاینده را حذف نمود. در انتهای دوره آزمون (پس از ۲۱ روز) فرم بیوفیلمی ۹۷/۱۷ و فرم پلانکتونی ۹۱/۳۷ درصد حذف فنانترن از محیط را نشان دادند. کل میزان فنانترن حذف شده تا پایان دوره آزمون در فرم رشدی پلانکتونی کمتر از میزان حذفی بود که در فرم رشدی بیوفیلمی در طی هفت روز انجام شده بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد با گذشت زمان میزان تجزیه فنانترن افزایش یافت. شیب ملایم کاهش میزان فنانترن باقی مانده در محیط تا پایان دوره آزمون ادامه داشت (شکل ۷). میزان فنانترن حذف شده در تیمارهای بدون باکتری که با مقدار یکسان بیوجار تیمار شده بودند به منظور بررسی میزان جذب



شکل ۶: نمودار غلظت باقی مانده فنانترن موجود در محیط تیمار شده با فرم رشدی بیوفیلم آئروجینوزا بر حامل بیوجار.



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و فرم رشدی بر میزان فنانترن باقی مانده (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی داری ندارند).

در لیتر با گذشت زمان انکوباسیون تعداد سلول‌های باکتری در فرم پلانکتونی و بیوفیلمی به ترتیب به طور معنی‌داری کاهش و افزایش یافت. نتایج حاضر نشان دهنده افزایش تحمل و سازگاری سریع‌تر باکتری‌ها در فرم بیوفیلمی به سطح بالای آلودگی فنانترون است. بررسی نتایج اثر سه گانه تیمارهای آزمایش بر فعالیت آنزیم لاکاز نشان داد که در طول دوره آزمون با گذشت زمان در هر دو فرم بیوفیلمی و پلانکتونی میزان تولید آنزیم لاکاز توسط باکتری سودوموناس آئروجینوزا به طور معنی‌داری افزایش یافت. آنزیم لاکاز باکتریایی یکی از مهمترین آنزیم‌های درگیر در فرآیند تخریب زیستی آلاینده‌های آلی از جمله هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای و فنانترن است. همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد با افزایش میزان غلظت فنانترن در محیط به دلیل وجود نداشتن منبع کربنی، باکتری مجبور به تخریب زیستی فنانترن بوده است. از این رو میزان تولید آنزیم لاکاز افزایش یافته است. هر چند این افزایش در طی ۱۴ روز اول اندک بود، اما در روز ۲۱ اندازه‌گیری آنزیم تفاوت معنی‌دار فعالیت با روز هفتم و ۱۴ را نشان داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده از برهم‌کنش سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنانترن و فرم بیوفیلمی باکتری در ۲۱ روز مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم لاکاز در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنانترن به ترتیب برای فرم رشدی بیوفیلمی در ۲۱، ۱۴ و ۷ روز و سپس فرم رشدی پلانکتونی در ۲۱ روز بود. میزان افزایش فعالیت آنزیم لاکاز در فرم رشدی بیوفیلمی تفاوت معنی‌داری با فرم پلانکتونی داشت که این افزایش در حضور آلاینده فنانترن بیشتر بود. میزان فعالیت آنزیم لاکاز در فرم رشدی بیوفیلمی باکتری سودوموناس آئروجینوزا در روز ۲۱ از ۳۰/۳ واحد در دقیقه در غلظت صفر فنانترن به ۳۹/۸ واحد در دقیقه در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن رسید. در فرم پلانکتونی نیز افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لاکاز مشاهده شد که از ۱۶/۶ واحد در دقیقه در غلظت صفر فنانترن به ۳۳/۱ واحد در دقیقه در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. نتایج نشان داد تجزیه فنانترن با استفاده از فرم رشدی بیوفیلمی به طور معنی‌داری بیشتر از فرم پلانکتونی بود. استفاده از بیوفیلم

حامل بیوجار به دلیل دارا بودن منبع گیاهی، عدم وجود مواد سمی و ساختار پر خلل و فرج بیشترین میزان رشد بیوفیلمی را در این پژوهش به خود اختصاص داد. مینگ (Ming) و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که خصوصیات فیزیکی شیمیایی بیوجار موجب بهبود شرایط زندگی ریزجانداران دخیل در امر تجزیه و تخریب آلاینده‌ها می‌گردد و موجب افزایش عملکرد تصفیه فاضلاب نفتی در راکتورهای زیستی می‌شود (۳۹). تحقیقات سون (Sun) و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که بیوجار تهیه شده از چوب درخت افرا توان فراهمی عناصر غذایی برای باکتری سودوموناس پوتیدا غیر متحرک شده بر آن را دارد (۴۰). نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد سلول‌های باکتری در محیط آلوده به فنانترون در فرم بیوفیلمی به طور معنی‌داری بیشتر از فرم پلانکتونی بود که نشان دهنده افزایش تحمل و سازگاری سریع‌تر باکتری‌ها در فرم بیوفیلمی است. امکان رشد و ازدیاد تعداد سلول در مدت زمان طولانی و هماهنگ شدن با شرایط محیط مانند پتانسیل‌های فرم رشدی بیوفیلمی است که به ویژه در محیط‌های آلوده به آلاینده‌های آلی با ماندگاری بالا در فرآیند زیست‌پالایی طولانی بسیار مهم و مطلوب می‌باشد (۴۱). تعداد بیشتر سلول‌های باکتری در فرم بیوفیلمی می‌تواند مربوط به چرخه حیات باکتری در فرم بیوفیلمی باشد. چرخه زندگی باکتری‌ها در فرم بیوفیلمی شامل مراحل اتصال به سطوح، رشد و تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید بیوفیلم با تعداد سلول کم (بیوفیلم نابالغ) و به دنبال آن بیوفیلم بالغ است و در نهایت سلول‌های باکتری از بیوفیلم جدا شده و به فرم آزاد در محیط پخش شده و یا با اتصال به سطوح جدید تولید بیوفیلم جدید می‌نمایند. به دلیل وجود پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی که مانع از رسیدن آلاینده در غلظت بالا به سلول‌های باکتری می‌شوند و در حقیقت آن‌ها را از تنش دور نگه می‌دارند، امکان بقا سلول‌ها افزایش می‌یابد که چنین حالتی برای باکتری در فرم پلانکتونی وجود ندارد (۴۲). در این پژوهش آنزیم لاکاز به عنوان آنزیم موثر در تجزیه فنانترون مورد سنجش قرار گرفت. تحقیقات مختلف اثر گذاری آنزیم لاکاز در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک را مورد بررسی و تایید قرار داده‌اند

توسط بیوجار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. میزان حذف فنانترون در تیمار بیوجار در طول دوره آزمایش معنی‌دار بود. میزان حذف فنانترون در زمان ۷، ۱۴ و ۲۱ روز به ترتیب ۹/۸، ۱۰/۸ و ۱۴ درصد بود (شکل ۶). میزان بازیافت روش مورد استفاده به منظور عصاره‌گیری و اندازه‌گیری میزان فنانترون باقی مانده توسط دستگاه HPLC برابر ۹۸٪ بود.

بحث

باکتری‌های جنس سودوموناس به دلیل فراوانی در خاک، قابلیت رشد در شرایط مختلف، داشتن خصوصیات محرک رشدی و استفاده گسترده برای اهداف پالایش خاک و آب، بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۲۷). بررسی توان تولید بیوفیلم ۶۳ باکتری سودوموناس جدا شده از خاک‌های آلوده به منابع هیدروکربنی در این پژوهش نشان داد که تمامی جدایه‌ها توان تولید بیوفیلم را دارا بودند. امروزه در تحقیقات مربوط به فرم رشدی بیوفیلمی از باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا به عنوان یک مدل استفاده می‌کنند. چرا که تحقیقات مختلف نشان داده‌اند مکانیسم‌هایی مانند حساسیت جمعیتی (Quorum sensing)، انتقال پیام بین سلولی، تحرک و چسبندگی به سطوح در این باکتری موجود و قابل بررسی است (۲۸ و ۲۹). محققان بسیاری توانمندی قابل توجه سودوموناس آئروژینوزا در تولید بیوفیلم را نشان داده‌اند (۳۰-۳۲). در این مطالعه تولید بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروجینوزا بر حامل‌های آلی و معدنی به طور موفقیت‌آمیز انجام شد و بررسی نتایج لگاریتم واحد شمارش کلنی نشان داد حامل‌های بیوجار و پرلینت بیشترین میزان بیوفیلم باکتری را داشتند. پیش از این نیز محققان مختلف تولید بیوفیلم سودوموناس‌ها را بر حامل‌هایی نظیر پرلینت (۳۳)، پومیس (۳۴)، باگاس (۳۵)، بیوجار (۳۶) و بیوپلاستیک (۳۸) گزارش کرده بودند. سان (Sun) و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که بیوجار به طور موفقیت‌آمیزی به عنوان یک حامل مقرون به صرفه و موثر برای باکتری‌های محرک رشد گیاه عمل می‌کند. نتایج آنها نشان داد بیوجار در تولید جمعیت بالای باکتری بسیار موثر است (۳۹).

بیوفیلمی باشد (۵۰). جانسن و همکاران (۲۰۰۵) معتقدند که احتمالاً میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده پلی‌آروماتیک موجود در داخل بیوفیلم می‌توانند PAHs محلول در آب را که در ساختمان پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی یا سطح سلول‌ها جذب شده‌اند را دریافت و به عنوان منبع کربنی استفاده و مورد تجزیه قرار دهند (۵۱). علاوه بر این تجزیه بیشتر فنانترون در حضور فرم بیوفیلمی باکتری سودوموناس *آئروجینوزا* می‌تواند به دلیل تحمل بیشتر این باکتری به فنانترون و همچنین جمعیت و رشد بیشتر آن در فرم بیوفیلمی نسبت به فرم پلانکتونی باشد (۵۲). چرا که سلول‌ها در فرم بیوفیلم به دلیل حضور در یک ماتریکس حفاظتی پتانسیل بیشتری برای زنده ماندن و سازگار شدن با محیط دارند. در واقع این ماتریکس به صورت یک سپر حفاظتی عمل کرده و سلول‌ها را در برابر تنش‌های محیط مصون نگه می‌دارد. همچنین به همین دلیل رشد سلول‌ها و فعالیت آنزیم لاکاز در داخل بیوفیلم بیشتر از حالت پلانکتونی است (۵۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که از بین ۴ جدایه منتخب، جدایه B59 (سودوموناس *آئروجینوزا*) کاراترین جدایه در تشکیل بیوفیلم و تجزیه نفت خام در محیط کشت مایع می‌باشد. در بین پنج حامل مورد بررسی بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم مربوط به حامل بیوچار بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد فرم بیوفیلمی باکتری سودوموناس *آئروجینوزا* به دلیل افزایش آستانه تحمل باکتری به سطح بالای آلودگی (افزایش لگاریتم واحد تشکیل کلنی) و تولید بیشتر آنزیم لاکاز نسبت به فرم پلانکتونی از توانایی بیشتری در تجزیه فنانترون برخوردار است. همچنین افزایش حذف فنانترون در حضور فرم بیوفیلمی باکتری با گذشت زمان انکوباسیون شدت بیشتری داشت که دلیل آن می‌تواند سازگاری سریع‌تر باکتری در فرم بیوفیلمی نسبت به سطح بالای آلودگی باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت

(۴۳). نتایج این پژوهش نشان داد تولید آنزیم لاکاز در محیط آلوده به فنانترون در فرم بیوفیلمی به طور معنی‌داری بیشتر از فرم پلانکتونی بود. این افزایش احتمالاً به دلیل جمعیت بیشتر سلول‌های فعال در فرم بیوفیلمی باشد که موجب تولید بیشتر آنزیم لاکاز در محیط می‌شود (۴۴). نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده رابطه مستقیم بین فعالیت آنزیم لاکاز و میزان فنانترون از محیط بود. با افزایش میزان فعالیت آنزیم لاکاز میزان حذف فنانترون از محیط افزایش یافت. تولید آنزیم لاکاز در باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* توسط آرون کومار (Arunkumar) و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شده است. آنزیم لاکاز که یک آنزیم اکسیداتیو است جزو دسته آنزیم‌های اکسیدو ردوکتازی است. این آنزیم به ساختمان حلقه بنزنی در فنانترون حمله کرده و با شکستن حلقه بنزنی تخریب ساختار ماده شروع می‌شود (۴۵). نتایج بدست آمده در این پژوهش مشابه نتایج تحقیق هان (Han) و همکاران (۲۰۰۴) بود. آنها دریافتند ترشح آنزیم لاکاز به همراه سایر آنزیم‌های لیگنینولیتیک اثر مستقیم بر میزان تجزیه فنانترون دارد. آنها نشان دادند میزان فعالیت آنزیم و در نتیجه میزان تجزیه فنانترون با گذشت زمان افزایش یافت (۴۶). در این تحقیق اثر تیمار محیط آلوده به فنانترون با فرم‌های بیوفیلمی و پلانکتونی باکتری نشان داد که پس از ۲۱ روز فرم بیوفیلمی مقدار فنانترون بیشتری را در مقایسه با فرم پلانکتونی از محیط مایع حذف کرد. پژوهش‌های متعددی گزارش کردند که فرم بیوفیلمی باکتری در مقایسه با فرم پلانکتونی، کارایی بیشتری در تجزیه آلاینده‌های آلی مختلف دارد (۴۷ و ۴۸). ژانگ (Zang) و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بیوفیلم کورینه باکتریوم مقاوم به شوری بر حامل بیوچار کارایی بالایی در تخریب ان-آلکان‌ها (۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۶، ۲۸ کربنه) و هیدروکربن‌های آروماتیک (نفتالن و پیرن) داشت و توانست بیش از ۷۸/۹ درصد از ترکیبات یاد شده را طی هفت روز تجزیه کند (۴۹). کارایی بیشتر فرم بیوفیلمی باکتری سودوموناس *آئروجینوزا* نسبت به فرم پلانکتونی آن در این پژوهش احتمالاً به دلیل افزایش دسترسی فنانترون برای باکتری سودوموناس *آئروجینوزا* در فرم

ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل همکاری در این مقاله رعایت کرده‌اند. تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و استفاده از دستگاه HPLC کمال‌قدردانی و سپاسگزاری را دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری بوده که با حمایت دانشگاه **تعارض در منافع** فردوسی مشهد به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از وجود ندارد.

References

1. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu. Rev. Med.*. 2008; 18: 59:415-28.
2. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *Journal of applied microbiology*. 2004; 96(5):1067-73.
3. Shakibaie MR. Bacterial biofilm and its clinical implications. *Annals of Microbiology and Research*. 2018; 2: 2(1).
4. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(9): 563.
5. Karn SK, Duan J, Jenkinson IR. Book review: Role of biofilms in bioremediation. *Frontiers in Environmental Science*. 2017; 15: 5:22.
6. Ramos JL, Marqués S, van Dillewijn P, Espinosa-Urgel M, Segura A, Duque E, Krell T, Ramos-González MI, Bursakov S, Roca A, Solano J. Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends in biotechnology*. 2011; 29(12): 641-7.
7. Chorom M, Hosseini SS. Bioremediation of Crude Oil-Polluted Soil by Sewage Sludge (Symposium 3.5. 2 Risk Assessment and Risk Based Remediation, < Special Issue> International Symposium: Soil Degradation Control, Remediation, and Reclamation, Tokyo Metropolitan University Symposium Series No. 2, 2010). *Pedologist*. 2011; 54(3): 294-301.
8. Kebria DY, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A, Amoozegar MA. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 2009; 6(3):435-42.
9. Demeter MA, Lemire J, Yue G, Ceri H, Turner RJ. Culturing oil sands microbes as mixed species communities enhances ex situ model naphthenic acid degradation. *Frontiers in microbiology*. 2015; 4(6):936.
10. Tremaroli V, Vacchi Suzzi C, Fedi S, Ceri H, Zannoni D, Turner RJ. Tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 to metals, polychlorobiphenyls and chlorobenzoates: effects on chemotaxis-, biofilm-and planktonic-grown cells. *FEMS microbiology ecology*. 2010;74(2): 291-301.
11. Zhang Y, Wang F, Zhu X, Zeng J, Zhao Q, Jiang X. Extracellular polymeric substances govern the development of biofilm and mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons for

- improved biodegradation. *Bioresource technology*. 2015; 193: 274-80.
12. Khoei NS, Andreolli M, Lampis S, Vallini G, Turner RJ. A comparison of the response of two *Burkholderia fungorum* strains grown as planktonic cells versus biofilm to dibenzothiophene and select polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian journal of microbiology*. 2016; 62(10): 851-60.
 13. Halan B, Schmid A, Buehler K. Real-time solvent tolerance analysis of *Pseudomonas* sp. strain VLB120ΔC catalytic biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 2011; 77(5): 1563-1571.
 14. Zingaro KA, Nicolaou SA, Papoutsakis ET. Dissecting the assays to assess microbial tolerance to toxic chemicals in bioprocessing. *Trends in biotechnology*. 2013; 31(11): 643-53.
 15. Mandal AK, Sarma PM, Singh B, Jeyaseelan CP, Channashettar VA, Lal B, Datta J. Bioremediation: an environment friendly sustainable biotechnological solution for remediation of petroleum hydrocarbon contaminated waste. *ARPN Journal of Science and Technology*. 2012; 2(8): 1-2.
 16. Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*. 2009 Jan;6(1):278-309.
 17. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2011; 30(47):e2437.
 18. Rahman KS, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*. 2002; 85(3): 257-261.
 19. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of molecular biology*. 1961; 3(2):208-IN1.
 20. Nie M, Nie H, He M, Lin Y, Wang L, Jin P, Zhang S. Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. *Journal of environmental management*. 2016;173: 34-40.
 21. Weber K, Delben J, Bromage TG, Duarte S. Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. *FEMS microbiology letters*. 2014; 350(2): 175-179.
 22. Kim EK, Ahn IS, LW L, ML S. Enhanced In-situ Mobilization and Biodegradation of Phenanthrens from Soil by a Solvent/Surfactant System. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2001; 11(4): 716-719.
 23. Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, 2001; 67(4): 1476-83.
 24. Kahng H, Nam K. Molecular characteristics of *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 in response to phenanthrene. 2002.

25. Xiong K, Pang Z, Wang B, Ji X, Liu Y, Yang G, Dong C, Chen J, Lucia L. Biomechanical Pulping of Poplar with Crude Enzyme Secreted from *Trametes* sp. Ig-9. *BioResources*. 2018; 13(2): 3420-8.
26. Nelson P. Index to EPA test methods. United States Environmental Protection Agency, Region I; 2003.
27. Wasi S, Tabrez S, Ahmad M. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental monitoring and assessment*. 2013; 185(10): 8147-55.
28. De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*. 2009; 11(2): 279-88.
29. Ha DG, O'Toole GA. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbial Biofilms*. 2015; 7: 301-317.
30. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology*. 2010; 5(11): 1663-1674.
31. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*. 2013; 121:1-58.
32. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*. 2015.
33. Emtiazi G, Shakarami H, Nahvi I, Mirdamadian SH. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *E. coli*. *African Journal of Biotechnology*. 2005 ;4(2):172-6.
34. Pazarlioğlu NK, Telefoncu A. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochemistry*. 2005; 40(5):1807-14.
35. Radhakrishnan MV, Sugumaran E. Efficacy of sugarcane bagasse to produce bacterial biofilm in water for fish culture. *Journal of Ecobiotechnology*. 2010.
36. Frankel ML, Bhuiyan TI, Veksha A, Demeter MA, Layzell DB, Helleur RJ, Hill JM, Turner RJ. Removal and biodegradation of naphthenic acids by biochar and attached environmental biofilms in the presence of co-contaminating metals. *Bioresource technology*. 2016; 216: 352-361.
37. Accinelli C, Saccà ML, Mencarelli M, Vicari A. Application of bioplastic moving bed biofilm carriers for the removal of synthetic pollutants from wastewater. *Bioresource technology*. 2012; 120:180-186.
38. Sun D, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and fertility of soils*. 2016; 52(4): 515-522.
39. Ming J, Wang Q, Yoza BA, Liang J, Guo H, Li J, Guo S, Chen C. Bioreactor performance using biochar and its effect on aerobic granulation. *Bioresource Technology*. 2020; 300: 122620.
40. Sun D, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and fertility of soils*. 2016; 52(4): 515-522.

41. Horemans B, Albers P, Springael D. The biofilm concept from a bioremediation perspective. 2015; 23-40
42. Demeter MA, Lemire JA, Turner RJ, Harrison JJ. Biofilm Survival Strategies in Polluted Environments. *Biofilms in Bioremediation: Current Research and Emerging Technologies*. 2016; 15: 43-56.
43. Chandra R, Chowdhary P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2015; 17(2): 326-42.
44. Arunkumar T, Alex Anand D, Narendrakumar G. Production and partial purification of laccase from *Pseudomonas aeruginosa* ADN04. *Journal of Pure & Applied Microbiology*. 2014; 8(2): 727-731.
45. Strong PJ, Claus H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2011; 41(4): 373-434.
46. Han MJ, Choi HT, Song HG. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *The Journal of Microbiology*. 2004; 42(2): 94-8.
47. Di Lorenzo A, Varcamonti M, Parascandola P, Vignola R, Bernardi A, Saceddu P, Sisto R, de Alteriis E. Characterization and performance of a toluene-degrading biofilm developed on pumice stones. *Microbial Cell Factories*. 2005; 4(1):4.
48. Liu J, Chen S, Ding J, Xiao Y, Han H, Zhong G. Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015; 99(24): 10839-51.
49. Zhang H, Tang J, Wang L, Liu J, Gurav RG, Sun K. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar. *Journal of Environmental Sciences*. 2016; 47:7-13.
50. Lerch TZ, Chenu C, Dignac MF, Barriuso E, Mariotti A. Biofilm vs. Planktonic Lifestyle: consequences for Pesticide 2, 4-D metabolism by *Cupriavidus necator* JMP134. *Frontiers in microbiology*. 2017; 23: 8:904.
51. Johnsen AR, Wick LY, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*. 2005; 133(1): 71-84.
52. Decho AW. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental shelf research*. 2000; 20(10-11): 1257-73.



Isolation screening, and efficiency of *Pseudomonas* isolates in biofilm formation on organic and inorganic carriers and phenanthrene bioremediation

Maryam Tarkashvand¹, Amir Lakzian², Amir Fotovat², Mehdi Mohammady³

¹PhD student in Soil Biology and Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Soil Science, Mashhad, Iran. ²Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Soil Science, Mashhad, Iran. ³Associate Professor, Persian Gulf University, Persian Gulf Research Institute, Biotechnology Department, Bushehr, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Microbial biofilms are one of the most important microorganism's forms of life in the environment. The aim of this study was to use native *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm form to clean up phenanthrene.

Material & Methods: Among 63 *Pseudomonas* isolates from Iranian soil, bacterial isolate with high potency in biofilm formation and crude oil degradation was selected and genetically identified. The effect of inorganic (raw pumice, processed pumice and perlite) and organic (biochar and sugarcane bagasse) carriers on biofilm formation was investigated. Biofilm structure was studied by scanning electron microscopy. Also, the effects of two growth form (biofilm, planktonic) on biochar carrier on laccase production and phenanthrene degradation in liquid media was investigated.

Results: Purified *Pseudomonas* isolates were screened based on biofilm formation and crude oil degradation. B59 (*Pseudomonas aeruginosa*) with 56.62% showed the highest percentage of crude oil degradation. Highest and lowest CFU belonged to biochar and processed Pumice with 8.8 and 2.9 respectively. Laccase activity was measured in biofilm form and planktonic form 39.8 and 33.1 $\text{U} \cdot \text{m}^{-1}$ respectively. Biofilm form of *Pseudomonas aeruginosa* led to 97.17% phenanthrene degradation where planktonic form reached 91.37%.

Conclusion: Results showed that biofilm form of *Pseudomonas aeruginosa* compared to planktonic form by significant increase in CFU and laccase activity result in more phenanthrene degradation in liquid media.

Keywords: Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Phenanthrene, Biochar, Laccase.

Correspondence to: Amir Lakzian

Tel: +98 9151135617

E-mail: Lakzian@um.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 6-20.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.