شناسایی برخی مشتقات بنزن به روش زیست سنجی توسط باکتری نورافشان *ویبریو* MM1 جدا شده از دریای مازندران

مجتبی محسنی[1*]، سیده فریبا پورسید[1] و محمدجواد چایچی[2]

[1] **ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه میکروبیولوژی**

[2] **ایران، بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه شیمی تجزیه**

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۲

چکیده

حضور انواع آلاینده‌های آلی از جمله بنزن و مشتقات آن در آب و فاضلاب به دلیل خطراتی که بر سلامت انسان و محیط زیست دارند موجب نگرانی گسترده شده است. از روش‌های مفید برای شناسایی حضور آلاینده‌ها در محیط‌زیست، سنجش سمیت بر اساس مهار نورتابی باکتری‌های نورافشان می‌باشد. هدف پژوهش حاضر، شناسایی حضور برخی مشتقات بنزن به روش زیست‌سنجی بر پایه مهار نورتابی باکتری بومی نورافشان *ویبریو* MM1 جدا شده از دریای مازندران بود. برای سنجش سمیت، غلظت های مختلف بنزن و برخی مشتقات آن با محیط رشد باکتری نورافشان مجاور شد. سمیت مشتقات بنزنی از طریق کاهش نورتابی *ویبریو* MM1 به کمک لومینومتر سنجیده شد. نتایج نشان داد نورتابی باکتری MM1 در حضور مشتقات بنزن کاهش چشمگیری داشت به طوریکه باکتری توانایی تشخیص غلظت‌های بسیار پایین تا $۱۰^{-۱۸}$ میلی‌گرم بر لیتر را داشت. همچنین مقادیر EC_{50} برای بنزن، اتیل‌بنزن، برموبنزن، کلروبنزن، آنیلین، کلروفنل، نیتروبنزن، رزورسینول و پیروکتکول بترتیب $۳٫۴۱\times۱۰^{-۱۴}$، $۷٫۸۳\times۱۰^{-۱۳}$، $۱٫۲۹\times۱۰^{-۸}$، $۲٫۹۱\times۱۰^{-۹}$، $۱٫۸۲\times۱۰^{-۵}$، $۳٫۲۸\times۱۰^{-۸}$، $۲٫۹\times۱۰^{-۳}$، ۲×۱۰^{-۴} و $۸٫۳\times۱۰^{-۳}$ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. برای ارزیابی سمیت حاد و سمیت مزمن مشتقات بنزن، پارامتر $T_{1/2}$ برای هر غلظت محاسبه شد. نتایج نشان داد اتیل‌بنزن با غلظت $۱٫۷\times۱۰^{-۱۰}$ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین سمیت حاد و نیتروبنزن با غلظت $۱٫۹\times۱۰^{-۸}$ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین سمیت مزمن با مقدار $T_{1/2}$ بترتیب ۱۵/۶ و ۴۷۱/۹ ثانیه بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد *ویبریو* MM1 بومی نورافشان می‌تواند برای شناسایی و سنجش سمیت آلاینده‌های زیست محیطی شامل مشتقات بنزن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مشتقات بنزن، سنجش سمیت، بیولومینسانس، *ویبریو* MM1

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۹۷، پست الکترونیکی: M.Mohseni@umz.ac.ir

مقدمه

رشد جمعیت و صنعتی شدن به میزان قابل توجهی، آلودگی آب و خاک را افزایش داده است. آلاینده‌های مختلف شامل ترکیبات آلی و معدنی در حجم زیاد و به طور دائم وارد محیط زیست می‌شود. در میان آلاینده‌های آلی، انواع هیدروکربن‌های آلیفاتیک، آروماتیک تک حلقه و چند حلقه، ترکیبات نیترو آروماتیک و کلرو آروماتیک سهم زیادی از آلودگی محیط زیست را به خود اختصاص داده است. آب‌های سطحی و زیرزمینی در معرض آلودگی به انواع آلاینده‌های آلی قرار دارند و یکی از علل اصلی ابتلا به بیماری‌ها و مرگ و میر در جهان به شمار می‌آید (۲۳). حضور انواع آلاینده‌های آلی از جمله بنزن و مشتقات آن در آب و فاضلاب به دلیل خطراتی که روی سلامت انسان و محیط زیست دارند، موجب نگرانی گسترده شده است.

به طوری که مواجه بیش از حد مجاز با این مواد موجب بروز انواع بیماری‌ها به ویژه سرطان خون می‌گردد (۲۴).

برای ارزیابی سمیت و خطرات زیست محیطی آلاینده‌ها، می‌توان از روش‌های آنالیز دستگاهی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و یا کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی (GC-MS) استفاده کرد. این روش‌ها به دلیل هزینه بالا، زمان طولانی آنالیز و نیاز به اپراتور با تجربه، محدودیت‌هایی ایجاد می‌کنند (۶). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، روش‌های زیست‌سنجی و ساخت بیوسنسورها جایگزین شده است که به دلیل پاسخ سریع، حساسیت بالا، هزینه کم و عدم نیاز به اپراتور متخصص، ابزار کارآمدی برای تشخیص آلاینده‌ها به شمار می‌آید (۸).

زیست‌سنجی روشی برای تجزیه و تحلیل اثرات سمی و تعیین غلظت آلاینده‌ها بر اساس تاثیرات آن روی موجودات زنده است که برای تشخیص خطرات زیست محیطی، شناسایی سمیت مواد شیمیایی یا محصولات تجاری، ارزیابی کیفیت آب و فاضلاب و تاثیر آن بر محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). در میان انواع روش‌ها، زیست‌سنجی بر اساس مهار نورتابی باکتری به دلیل سرعت و حساسیت بالا و هزینه کم، اغلب به عنوان اولین روش غربالگری انتخاب می‌شود. در شرایط بهینه، باکتری نورافشان توانایی ساطع کردن نور سبز-آبی را دارد اما در حضور آلاینده‌ها و مواد سمی نظیر یون فلزات سنگین، هیدروکربن‌های آروماتیک، حشره‌کش‌ها و... نورتابی باکتری کاهش یافته و یا از بین می‌رود (۱۷).

مهم ترین پارامتر سمیت‌شناسی در زیست‌سنجی مهار بیولومینسانس، EC_{50} (Effective concentration) است یعنی غلظتی از آلاینده که نورتابی باکتری را حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (۴).

در پژوهش حاضر سنجش آلاینده‌های هیدروکربنی شامل برخی مشتقات بنزنی به روش زیست‌سنجی بر پایه مهار نورتابی کشت تازه باکتری *ویبریو* MM1 جدا شده از دریای مازندران بررسی شد. همچنین سمیت حاد و مزمن آلاینده‌های بنزنی بر سیستم نورتابی زیستی باکتری نورافشان به کمک رسم منحنی لومینومتری مطالعه گردید.

مواد و روشها

کشت باکتری نورافشان *ویبریو* MM1: در پژوهش حاضر از باکتری نورافشان *ویبریو* MM1 که قبلا در آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی محیطی و تنوع زیستی دانشگاه مازندران از آب دریای مازندران جدا شده بود، استفاده شد (۱۸). برای کشت باکتری، محیط کشت اختصاصی مایع SWB (Sea water broth) تهیه شد. محیط کشت SWB با مخلوط کردن پپتون ۰٫۵ گرم، عصاره مخمر ۰٫۵ گرم، عصاره گوشت ۰٫۳ گرم، سدیم کلراید ۲٫۴ گرم، پتاسیم کلراید ۰٫۰۷ گرم، منیزیم کلراید ۰٫۵۳ گرم، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰٫۷ گرم، کلسیم کلراید ۰٫۰۱، گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه شد (pH=۷٫۰±۰٫۲). همچنین برای مشاهده نورافشانی کلنی باکتری از محیط کشت آگاردار SWA استفاده شد. این محیط کشت با افزودن ۱٫۵ درصد آگار به محیط کشت مایع SWB تهیه شد (۱۹). پس از تلقیح باکتری در محیط کشت، گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بررسی رشد و نورافشانی *ویبریو* MM1 : برای بررسی رشد و نورافشانی باکتری بترتیب از روش‌های اسپکتروفتومتری و لومینومتری استفاده شد. پس از شستشوی سلولی از کشت ۲۴ ساعته سویه MM1، سوسپانسیون رسوب سلولی در محیط کشت استریل تهیه شد و با غلظت یک درصد به محیط کشت تازه SWB تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. برای سنجش رشد باکتری، میزان جذب نوری محیط رشد در زمان‌های مختلف در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (CT-Chrom Tech 2200) اندازه گیری شد. همزمان با بررسی رشد *ویبریو* MM1، شدت نسبی نورتابی باکتری به کمک لومینومتر (Berthold) ثبت گردید (۹).

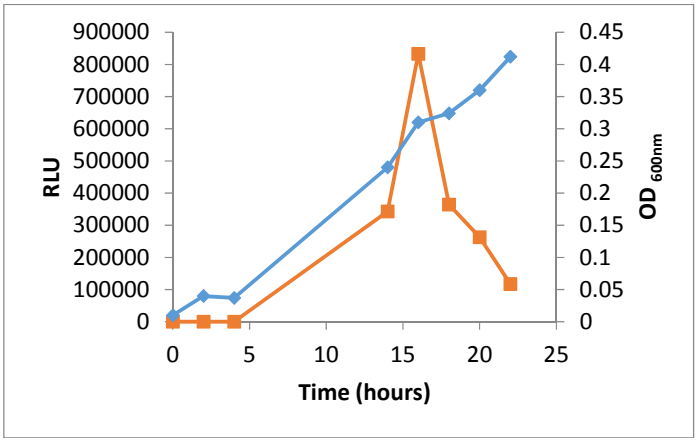
شدت نورتابی با واحد نسبی لومینسانس یا RLU (Relative Luminescence Unit) اندازه‌گیری می‌شود و متناسب با شدت نور بر حسب فوتون بر ثانیه محاسبه می‌گردد (۱۱).

سنجش سمیت مشتقات بنزن توسط *ویبریو* MM1 : برای سنجش سمیت مشتقات بنزن، از سویه نورافشان MM1 استفاده شد. محیط کشت SWB تلقیح شده با باکتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۱۶ ساعت رشد، ارلن به مدت یک ساعت در گرمخانه شیکردار و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا محیط رشد باکتری یکنواخت شود. محلول ذخیره مشتقات بنزن با غلظت مناسب در آب دیونیزه تهیه گردید. برای حل شدن بهتر مشتقات بنزن، محلول ذخیره به مدت یک شبانه روز در تاریکی (جلوگیری از تخریب نوری مشتقات بنزن) و دمای اتاق نگهداری شد (۱۶). بنزن و مشتقات آن شامل آنیلین، اتیل‌بنزن، نیتروبنزن، کلروبنزن، کلروفنل، برموبنزن، رزورسینول و پیروکتکول بود. سپس به کمک محلول ذخیره، غلظت $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۱۸}$ از مشتقات بنزن تهیه شد. پس از سنجش اولیه میزان نورتابی محیط رشد ۱۴-۱۶ ساعت *ویبریو* MM1، سنجش سمیت مشتقات بنزن انجام شد. حجم یک میلی‌لیتر از محیط رشد MM1 با یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن به طور جداگانه در لوله مخصوص لومینومتر (Berthold) مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه مجاورسازی شد (۵). نورتابی لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن و سوسپانسیون باکتری هر ۵ ثانیه و به مدت ۱۴۰ ثانیه به صورت RLU یا شدت نسبی نورتابی توسط لومینومتر ثبت شد.

آنالیز داده‌های سنجش سمیت: پس از رسم منحنی کاهش نورتابی *ویبریو* MM1 بر اساس غلظت مشتقات بنزن و شدت نسبی نورتابی (RLU)، معادله خط منحنی‌ها بدست آمد و پارامتر EC_{50} برای هر ترکیب محاسبه شد. سمیت مشتقات بنزنی به کمک پارامتر EC_{50} یا غلظت موثر هر ترکیب که باعث کاهش ۵۰ درصد شدت نورتابی باکتری می‌شود، مورد ارزیابی قرار گرفت (۳). همچنین پارامتر R^2 یا ضریب همبستگی در منحنی کاهش نورتابی باکتری در حضور غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن بدست آمد (۲۱). علاوه بر آن، لگاریتم نپرین شدت نسبی نورتابی باکتری (RLU) در حضور غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن محاسبه شد و لومینومتری سیستم نورتابی زیستی MM1 (بر اساس لگاریتم نپرین RLU نسبت به زمان) انجام شد. پس از رسم منحنی و تعیین معادله خط، پارامترهای $T_{1/2}$ و $T_{3/4}$ محاسبه گردید. مطابق تعریف زمان مورد نیاز برای کاهش ۵۰ درصد و ۷۵ درصد نورتابی باکتری را بترتیب $T_{1/2}$ و $T_{3/4}$ گویند (۲۲).

نتایج

رشد و نورتابی *ویبریو* MM1: پس از کشت سویه نورافشان MM1 در محیط کشت اختصاصی SWB، منحنی رشد باکتری به کمک سنجش جذب نوری محیط رشد در طول موج ۶۰۰ نانومتر و در فواصل زمانی مشخص رسم شد. به طور همزمان میزان نورتابی *ویبریو* MM1 در محیط رشد بررسی و منحنی شدت نسبی نورتابی باکتری بر حسب زمان رسم شد. نتایج در شکل ۱ نشان می‌دهد رشد باکتری پس از ۴ ساعت آغاز شد و با گذشت زمان میزان جذب نوری محیط رشد افزایش یافت. به طوری که جذب نوری محیط رشد پس از ۱۴ ساعت گرمخانه گذاری، به بیش از ۶ برابر رسید. همچنین نتایج بررسی شدت نسبی نورتابی باکتری نشان می‌دهد که نورتابی باکتری متناسب با رشد باکتری افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد شدت نورتابی پس از ۱۶ ساعت رشد از کمتر از RLU ۱۰۰ به RLU ۸۳۲۷۶۰ رسید. نتایج شکل ۱ نشان می‌دهد شدت نورتابی پس از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری روند کاهشی داشت به طوری که پس از ۲۲ ساعت به RLU ۱۱۷۳۰۱ رسید.



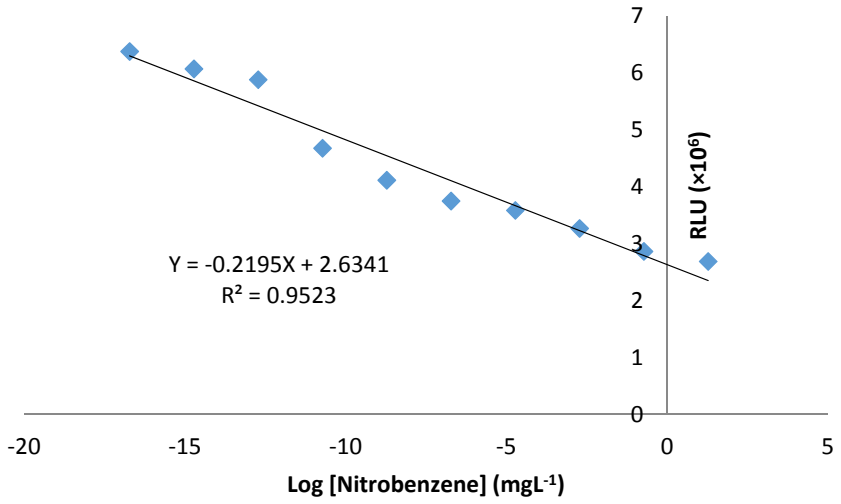
شکل ۱- رشد(♦) و شدت نورتابی (■) *ویبریو* MM1 در محیط کشت مایع SWB.

سنجش سمیت مشتقات بنزن در آب توسط *ویبریو* MM1 : برای بررسی سنجش سمیت، سویه MM1 با غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن به طور مجزا مجاور شد و نورتابی باکتری به کمک لومینومتر سنجیده شد. سپس منحنی کاهش نورتابی باکتری در حضور هر یک از مشتقات بنزن رسم شد. نتایج سنجش سمیت نیتروبنزن (از طریق رسم منحنی کاهش نورتابی باکتری) نشان می‌دهد کاهش نورتابی از غلظت $۱/۹\times۱۰^{-۱۳}$ میلی‌گرم بر لیتر آغاز شد، به طوری که شدت نورتابی در غلظت $۱/۹\times۱۰^{-۱۱}$ میلی‌گرم بر لیتر حدود یک میلیون RLU کاهش یافت (شکل ۲). همچنین نتایج نشان می‌دهد نورتابی باکتری در حضور نیتروبنزن با غلظت $۱/۹\times۱۰^{-۳}$ میلی‌گرم بر لیتر، به نصف کاهش یافت (EC_{50}). اگرچه با افزایش غلظت نیتروبنزن، کاهش نورتابی باکتری استمرار یافت.

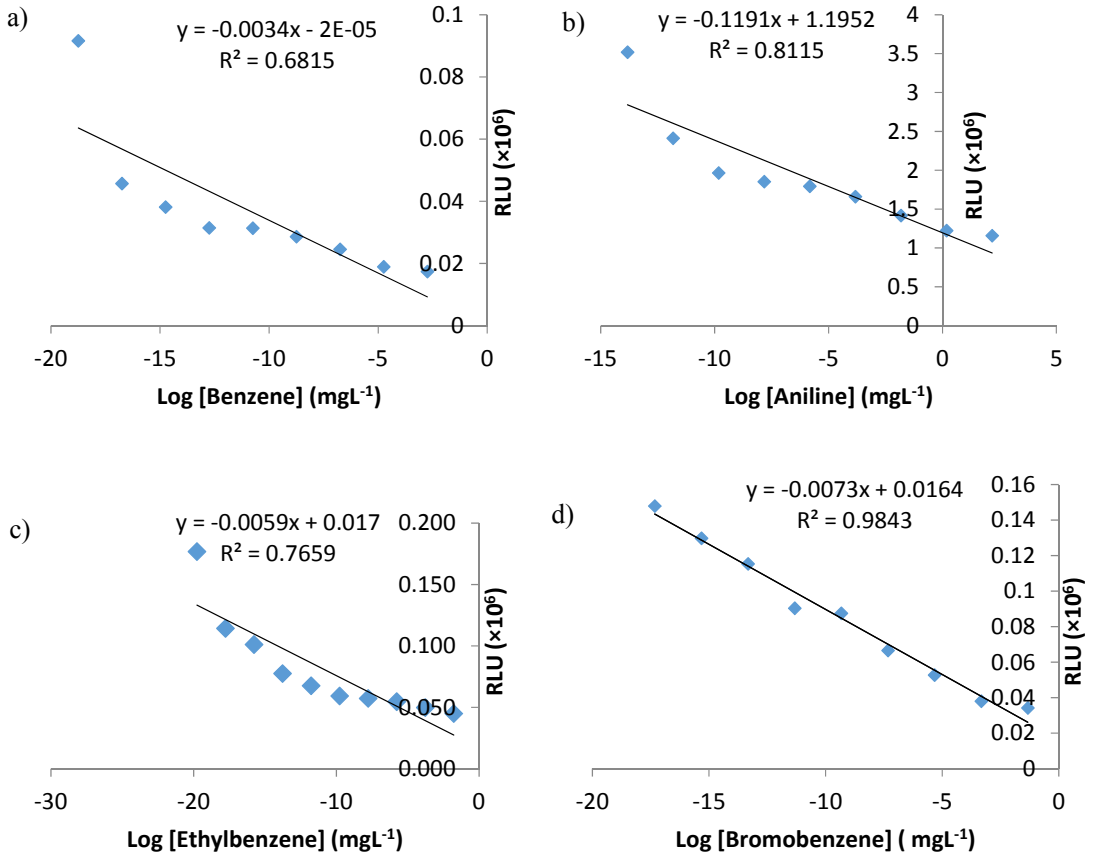
همچنین تاثیر ۸ ترکیب بنزنی دیگر بر نورتابی باکتری بررسی شد و منحنی کاهش نورتابی رسم شد (شکل ۳). منحنی کاهش نورتابی در شکل ۳ نشان داد با افزودن غلظت‌های بسیار پایین از ترکیبات بنزن به سوسپانسیون باکتری، اثرات سمی آن با کاهش نورتابی *ویبریو* MM1 نمایان شد. این نتایج نشان دهنده حساسیت بسیار زیاد سویه MM1 به سمیت مشتقات بنزن است به طوری که افزایش غلظت ترکیبات بنزنی با کاهش شدت نورتابی باکتری، رابطه مستقیم داشت. همچنین نتایج سنجش پارامترهای EC_{50} و R^2 و نیز معادله خط در جدول ۱ خلاصه شده است. این نتایج نشان می‌دهد بیشترین سمیت مربوط به برموبنزن و کمترین سمیت مربوط به اتیل‌بنزن با مقدار EC_{50} بترتیب $۱/۲۹\times۱۰^{-۸}$ و $۷/۸۳\times۱۰^{-۱۳}$ میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول ۱).

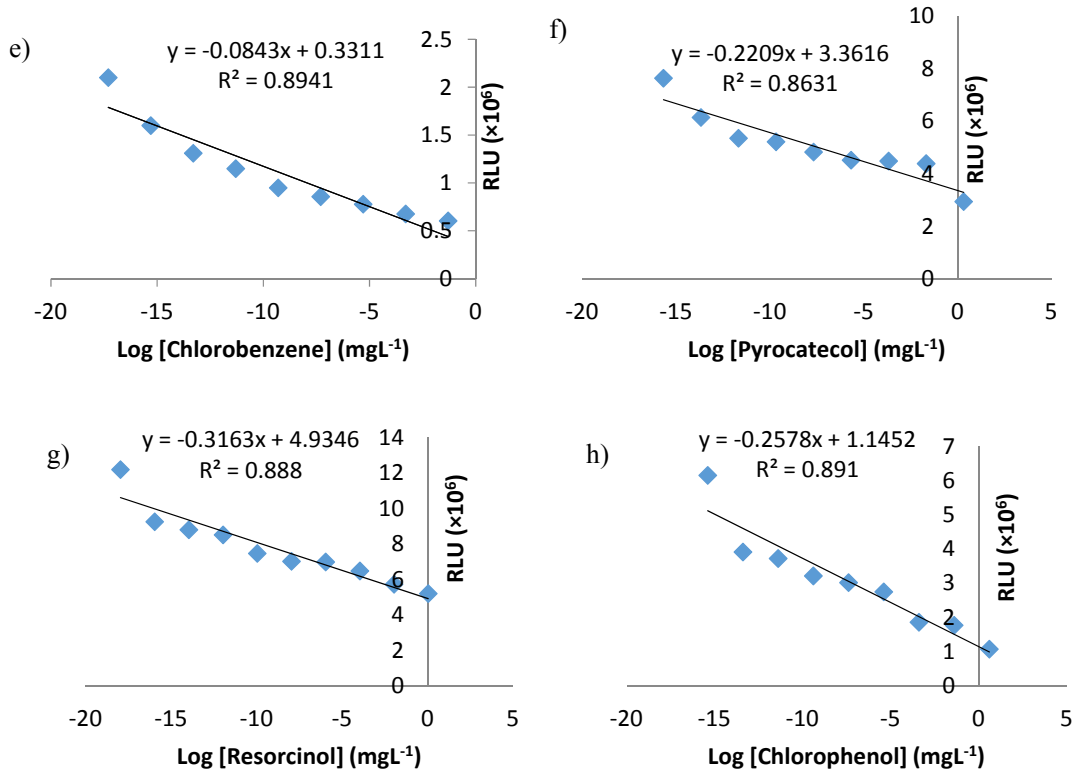
جدول ۱- مقادیر EC_{50}، R^2 و معادله خط برخی مشتقات بنزن براساس سنجش سمیت توسط *ویبریو* MM1.

مشتقات بنزن	معادله خط	R^2	EC_{50} (mgL^{-1})
بنزن	$Y=-0.0034X-2\times10^{-5}$	۰٫۶۸۱۵	$۳٫۴۱ \times ۱۰^{-۱۴}$
اتیل بنزن	Y=-0.0059X+0.017	۰٫۷۶۵۹	$۷٫۸۳ \times ۱۰^{-۱۳}$
برمو بنزن	Y=-0.0073X+0.0164	۰٫۹۸۴۳	$۱٫۲۹ \times ۱۰^{-۸}$
نیتروبنزن	Y=-0.2195X+2.6341	۰٫۹۵۲۳	$۲٫۹ \times ۱۰^{-۳}$
کلرو بنزن	Y=-0.0843X+0.3311	۰٫۸۹۴۱	$۲٫۹۱ \times ۱۰^{-۹}$
کلروفنل	Y=-0.2578X+1.1452	۰٫۸۹۱	$۳٫۲۸ \times ۱۰^{-۸}$
رزورسینول	Y=-0.3163X+4.9346	۰٫۸۸۸	۲×۱۰^{-۴}
پیروکتکول	Y=-0.2209X+3.3616	۰٫۸۶۳۱	$۸٫۳ \times ۱۰^{-۳}$
آنیلین	Y=-0.1191X+1.1952	۰٫۸۱۱۵	$۱٫۸۲ \times ۱۰^{-۵}$



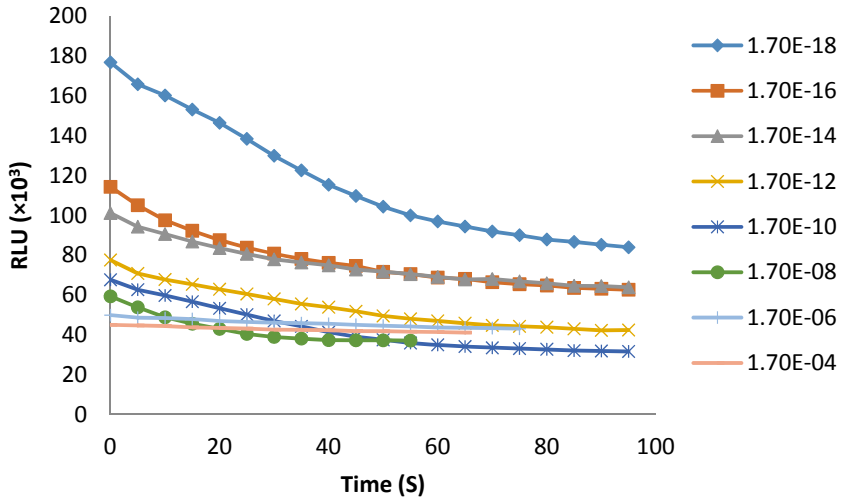
شکل ۲- سنجش سمیت نیتروبنزن به روش زیست‌سنجی مهار نورتابی *ویبریو* MM1.





شکل ۳- سنجش سمیت ترکیبات بنزنی به روش زیست‌سنجی مهار نورتابی *ویبریو* MM1: بنزن (a)، آنیلین (b)، اتیل‌بنزن (c)، برموبنزن (d)، کلروبنزن (e)، پیروکتکول (f)، رزورسینول (g) و کلروفنل (h).

تعیین بیشترین سمیت حاد و مزمن غلظت‌های مختلف مشتقات بنزن بر سیستم نورتابی زیستی *ویبریو* MM1: نورتابی باکتری در حضور هر غلظت از مشتقات بنزن به طور مجزا و در هر ۵ ثانیه طی مدت ۱۴۰ ثانیه توسط لومینومتر ثبت شد. پس از رسم منحنی لومینومتری مشتقات بنزن (براساس شدت نسبی نورتابی باکتری و زمان) و به کمک معادله خط، پارامتر $T_{1/2}$ و $T_{3/4}$ هر منحنی محاسبه شد و در جدول ۲ خلاصه شده است. بیشترین سمیت حاد و نیز بیشترین سمیت مزمن بترتیب بر اساس کمترین و بیشترین مقدار $T_{1/2}$ محاسبه می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۲ از بین ترکیبات بنزنی، اتیل‌بنزن با غلظت $۱٫۷\times ۱۰^{-۱۰}$ میلی‌گرم بر لیتر دارای بیشترین سمیت حاد و نیتروبنزن با غلظت $۱٫۹\times ۱۰^{-۸}$ میلی-گرم بر لیتر دارای بیشترین سمیت مزمن با مقدار $T_{1/2}$ بترتیب ۱۵٫۶ و ۴۷۱٫۹ ثانیه بود. همچنین به عنوان نمونه منحنی لومینومتری اتیل‌بنزن در شکل ۴ نشان داده شد. شیب منحنی نورتابی *ویبریو* MM1 در غلظت‌های $۱٫۷\times۱۰^{-۱۸}$، $۱٫۷\times۱۰^{-۱۶}$، $۱٫۷\times۱۰^{-۱۲}$ و $۱٫۷\times۱۰^{-۱۰}$ میلی‌گرم بر لیتر اتیل بنزن کاهش شدید داشت و نورتابی باکتری با سرعت چشمگیری کاهش یافت.



شکل ۴- منحنی لومینومتری سیستم نورتابی *ویبریو* MM1 بر اساس شدت نور بر حسب زمان در حضور غلظت‌های مختلف اتیل‌بنزن.

جدول ۲- مقادیر $T_{1/2}$ و $T_{3/4}$ غلظت‌های مختلف برخی مشتقات بنزن بر اساس سنجش سمیت توسط *ویبریو* MM1.

مشتقات بنزن / غلظت‌ها (mgL^{-1})		$۱۰^{-۱۸}$	$۱۰^{-۱۶}$	$۱۰^{-۱۴}$	$۱۰^{-۱۲}$	$۱۰^{-۱۰}$	$۱۰^{-۸}$	$۱۰^{-۶}$	$۱۰^{-۴}$
نیتروبنزن	$T_{1/2}$	۷۲٫۹	۳۸٫۳	۴۴٫۵	۹۰٫۴	۶۷٫۵	۴۷۱٫۹	۲۹۰٫۴	۷۲
	$T_{3/4}$	۳۰٫۵	۱۵٫۳	۱۸٫۵	۳۸٫۵	۲۸٫۳	۱۹۸٫۹	۱۱۹٫۵	۲۹٫۶
بنزن	$T_{1/2}$	۲۳٫۳	۱۶۵	۱۷۸٫۸	۱۸۴٫۲	۲۹۱٫۳	۳۹۶	۱۷۴٫۲	۲۸٫۱
	$T_{3/4}$	۵٫۴	۵۱٫۱	۷۴٫۲	۸۱٫۱	۱۳۵٫۷	۱۶۱٫۳	۷۱٫۶	۱۲٫۳
پیروکتکول	$T_{1/2}$	۳۸٫۳	۴۱٫۳۹	۲۷٫۰۴	۲۷٫۰۴	۳۱٫۲۸	۳۱۵٫۹	۹۸٫۳	۱۵۶٫۴
	$T_{3/4}$	۳۱٫۲	۳۳٫۱۲	۱۱٫۸۹	۱۱٫۸۹	۱۱٫۵۷	۱۳۴	۴۰٫۵۶	۶۵٫۸
اتیل بنزن	$T_{1/2}$	۱۶٫۷	۲۰٫۶	۲۸٫۲	۲۰٫۵	۱۵٫۶	۵۸٫۸	۷۳٫۴	۱۰۰٫۸
	$T_{3/4}$	۶٫۸۵	۶٫۸۶	۱۰٫۲	۷٫۴۵	۵٫۸	۵٫۴۶	۳۰٫۸۵	۴۳٫۷۱
آنیلین	$T_{1/2}$	۲۶۶	۲۰۸٫۰۱	۳۴۸٫۸	۱۴۴٫۰	۱۳۳	۱۷۵٫۲	۶۶٫۹	۱۴۱٫۲
	$T_{3/4}$	۶۳	۳۹٫۶۷	۱۷۶٫۸	۵۹٫۳	۵۴٫۸	۷۳٫۳	۲۸٫۳	۵۷٫۵
کلروفنل	$T_{1/2}$	۵۵٫۹	۳۹۸٫۷	۱۶۹	۱۳۲٫۴	۳۱٫۶	۲۴٫۳	۶۵۷٫۵	۱۱۵٫۹
	$T_{3/4}$	۲۲٫۴	۱۶۱٫۹	۷۲٫۴	۵۵٫۲	۱۲٫۸	۱۰٫۲۱	۲۷۸٫۷	۴۹
برموبنزن	$T_{1/2}$	۲۵٫۳	۶۴٫۱	۲۸٫۹	۴۱٫۱	۸۱٫۵	۹۸٫۵	۸۹٫۶	۲۰٫۳
	$T_{3/4}$	۱۰٫۷	۲۶٫۱	۱۳٫۳	۱۷٫۹	۳۷٫۴	۴۱٫۲	۳۸٫۳	۸٫۶
کلروبنزن	$T_{1/2}$	۵۷٫۱۵	۱۹٫۱۹	۲۹۵	۶۱٫۴	۵۷	۸۵	۱۲۶٫۲	۴۳٫۳
	$T_{3/4}$	۲۳٫۱۱	۱۷٫۱۴	۱۲۵٫۳	۲۵٫۶	۴۸٫۴	۳۵٫۲	۵۳٫۶	۱۸٫۳
رزورسینول	$T_{1/2}$	۹۱٫۲	۹۰٫۸	۱۸۲٫۵	۴۷٫۳	۳۵۵٫۷	۱۴٫۹۹	۱۷۸٫۸	۶۳۰
	$T_{3/4}$	۳۷٫۲	۳۸٫۲	۷۶٫۷	۱۸٫۹	۱۳۱٫۹	۱۵٫۳۹	۷۴	۲۶۶٫۳

بحث

در سال‌های اخیر، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی، دریاها و اقیانوس‌ها به دلیل اهمیتی که برای زندگی انسان و آبزیان دارند، به مسئله‌ای جدی در سطح جهان تبدیل شده است. یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آب، هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد که منشا آن ضایعات و پسماند صنایع مختلف، پالایشگاه‌های نفت و گاز، حمل و نقل دریایی و نیز آتشفشان است (۱۰).

هیدروکربن‌های آروماتیک به ویژه مشتقات بنزن به واسطه سمیت زیاد و پایداری بالا در محیط زیست، و نیز داشتن اثرات حاد و مزمن از طریق ایجاد بیماری‌هایی نظیر سرطان، ناهنجاری ژنتیکی، اختلال در تولید مثل، اختلالات عصبی و ... مورد توجه قرار می‌گیرند (۲۵).

روش‌های مختلف آنالیز دستگاهی برای سنجش سمیت آلاینده‌های تخلیه شده به محیط زیست وجود دارد. برای غلبه بر محدودیت‌های سنجش سمیت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، سنجش زیستی معرفی شده است (۱). از آن‌جا که روش‌های سنجش آلاینده‌ها مبتنی بر حیوانات، گیاهان و جلبک‌ها، وقت‌گیر و هزینه‌بر است سنجش زیستی بر پایه باکتری‌های نورافشان به دلیل پاسخ سریع آنها به سموم شیمیایی و یا زیستی، به عنوان روش‌های غربالگری اولیه به کار گرفته می‌شوند (۱۲).

برای انجام سنجش سمیت توسط باکتری نورافشان، به باکتری‌هایی با توانایی نورتابی پایدار نیاز است. لذا در پژوهش حاضر از باکتری نورافشان *ویبریو* MM1 با قابلیت نورتابی مطلوب استفاده شد. آنالیز تطبیقی قبلی توالی ژن 16S rRNA *ویبریو* MM1 نشان داد این سویه بیش از ۹۹٪ هومولوژی با باکتری نورافشان *ویبریو کمپلی* دارد (۱۹). نتایج رشد و نورافشانی *ویبریو* MM1 نشان داد رشد باکتری از ساعت‌های اولیه تلقیح در محیط کشت SWB آغاز و با گذشت زمان افزایش یافت. در حالیکه شدت نورتابی باکتری تا ۶ ساعت ابتدای رشد بسیار کم بود اما بعد از ۱۴ ساعت گرمخانه گذاری افزایش پیدا کرد. این نتایج نشان می‌دهد نورتابی با پدیده حد نصاب احساس در باکتری ها قابل توجیه می‌باشد. آنتزبرگر و همکارانش نشان دادند *ویبریو هارویی* یکی از بهترین ارگانیسم‌های مشخص شده در پدیده حدنصاب احساس است. در این پژوهش آنالیز میزان نورتابی با فرآیند حدنصاب احساس در سویه وحشی *ویبریو هارویی* نشان داد در تراکم سلولی بالا، ۶۹ ٪ از سلول‌های باکتری توانایی نورافشانی دارند. در ساعات ابتدایی رشد، تراکم سلولی باکتری‌ها و همچنین غلظت خود القاگرهای وارد شده به محیط رشد پایین است. با گذشت زمان و افزایش رشد و تراکم سلولی باکتری، غلظت خود القاگرهای مورد نیاز برای پدیده حدنصاب احساس به حد آستانه می‌رسد و توسط رسپتورهای اختصاصی موجود در غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها شناسایی می‌شود. شناسایی سیگنال‌ها توسط رسپتورها، علاوه بر بیان ژن‌های ضروری برای انجام عملکردهای گروهی مانند نورتابی، منجر به فعال‌سازی تولید مجدد سیگنال‌ها شده و در نتیجه نورافشانی باکتری در سطح مطلوب و پایدار ادامه می‌یابد (۲).

هیدروکربن‌های آروماتیک به خصوص مشتقات بنزن به واسطه فعالیت‌های صنعتی، به طور مستمر وارد محیط زیست می‌شوند و سمیت و پایداری زیادی در محیط طبیعی دارند. در پژوهش حاضر سنجش سمیت ۹ ترکیب بنزنی شامل بنزن، آنیلین، اتیل‌بنزن، برموبنزن، نیتروبنزن، کلروبنزن، کلروفنل، رزورسینول و پیروکتکول به کمک باکتری *ویبریو* MM1 ارزیابی شد. در پژوهشی مشابه هارتنیک و نورلی در سال ۲۰۰۷، برای سنجش سمیت ترکیبات بنزنی در آب‌های زیرزمینی، از دستگاه‌های GC-MS و HPLC و نیز از باکتری *ویبریو فیشری* در کیت استاندارد Microtox استفاده کردند (۷). مقایسه نتایج حاصل از سنجش سمیت به کمک *ویبریو* MM1 و *ویبریو فیشری* نشان داد مقدار EC_{50} برای بنزن بترتیب ۱۴-

$۳/۴۱\times۱۰$ و ۱۰۲/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر و برای اتیل‌بنزن بترتیب $۷/۸۳\times۱۰^{-۱۳}$ و ۹/۶۹ میلی‌گرم بر لیتر بود. این نتایج نشان می‌دهد *ویبریو* MM1، در مقایسه با *ویبریو* فیشری لیوفیلیزه در کیت استاندارد Microtox، حساسیت بسیار بیشتری به دو آلاینده بنزن و اتیل بنزن دارد. علاوه بر آن، مقایسه مقادیر EC_{50} برگرفته از پژوهش پاروز و همکارانش به کمک *ویبریو فیشری* (۲۰) و نیز نتایج *ویبریو* MM1 مطالعه حاضر برای آنیلین بترتیب ۲۵۷ و $۱/۸۴\times۱۰^{-۵}$ میلی‌گرم بر لیتر و برای اتیل‌بنزن بترتیب ۶ و $۷/۸۳\times۱۰^{-۱۵}$ میلی‌گرم بر لیتر بود. این نتایج نشان از حساسیت بالا *ویبریو* MM1 به غلظت‌های بسیار پایین مشتقات بنزنی نسبت به *ویبریو فیشری* دارد.

همچنین لی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطالعه روی مهار بیولومینسانس باکتری *ویبریو فیشری* در حضور هیدروکربن‌های آروماتیک شامل بنزن و مشتقات آن و نیز هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه انجام دادند. نتایج این تحقیق، مهار بیولومینسانس در حضور این ترکیبات را تایید کرد و نشان داد، با افزایش غلظت این ترکیبات میزان سمیت بیشتر شده و مهار لومینسانس بیشتر می‌شود. همچنین مشخص شد مقدار EC_{50} هر ماده از مقدار انحلال پذیری آن ماده در آب، کمتر است. مقایسه نتایج حاصل از سنجش سمیت به کمک *ویبریو* MM1 و کشت تازه *ویبریو فیشری* نشان داد مقدار EC_{50} برای بنزن بترتیب $۳/۴۱\times۱۰^{-۱۴}$ و ۱۳/۸۲۳ میلی‌گرم بر لیتر و برای اتیل‌بنزن بترتیب $۷/۸۳\times۱۰^{-۱۳}$ و ۲/۶۳۷ میلی‌گرم بر لیتر بود. این نتایج نشان می‌دهد کشت تازه *ویبریو* MM1، در مقایسه با کشت تازه *ویبریو فیشری*، حساسیت بسیار بیشتری در سنجش دو آلاینده بنزن و اتیل بنزن دارد (۱۵).

همچنین نتایج لومینومتری سیستم نورتابی *ویبریو* MM1 بر اساس محاسبه پارامتر $T_{1/2}$ نشان داد این باکتری نورافشان توانایی تشخیص سمیت حاد و مزمن آلاینده‌ها را دارد. ترکیبات سمی و کشنده به طور گسترده به محیط زیست وارد می‌شوند که علاوه بر زمان اثرگذاری بلند مدت و به صورت مزمن روی موجودات زنده، میزان سمیت و کشندگی بالایی نیز دارند. مقادیر زیاد پارامترهای $T_{1/2}$ و $T_{3/4}$ در سیستم‌های نورتابی نمایانگر اثرگذاری بلند مدت و مزمن ترکیبات آلاینده می‌باشد. در این سیستم‌ها این نگرانی وجود ندارد که برای سنجش سمیت، حتما از بیشینه شدت نورتابی باکتری استفاده شود. همچنین اندازه گیری سمیت در طی زمان و با خطای کمتری همراه است (۱۴و۲۲).

به طور کلی نتایج سنجش سمیت نشان می‌دهد باکتری *ویبریو* MM1، حساسیت بالایی در زیست‌سنجی و تشخیص غلظت بسیار پایین مشتقات بنزن را دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد *ویبریو* MM1 گزینه مناسبی در زمینه زیست‌سنجی مهار نورتابی بوده و می‌تواند برای تشخیص سریع آلاینده‌های زیست محیطی به ویژه مشتقات بنزن در نمونه‌های طبیعی آبی و نیز پساب صنایع مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., ... & Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. Science of the Total Environment, 626, 1295-1309.

2- Anetzberger, C., Pirch, T., & Jung, K. (2009). Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. Molecular microbiology, 73(2), 267-277.

3- Bundy, J. G., Wardell, J. L., Campbell, C. D., Killham, K., & Paton, G. I. (1997). Application of bioluminescence-based microbial biosensors to the ecotoxicity assessment of organotins. Letters in Applied Microbiology, 25(5), 353-358.

4- Drzyzga, O., Gorontzy, T., Schmidt, A., & Blotevogel, K. H. (1995). Toxicity of explosives and related compounds to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 28(2), 229-235.

5- El-Alawi, Y. S., McConkey, B. J., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2002). Measurement of short-and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. Ecotoxicology and Environmental Safety, 51(1), 12-21.

6- 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.

7- Hartnik, T., Norli, H. R., Eggen, T., & Breedveld, G. D. (2007). Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. Chemosphere, 66(3), 435-443.

8- Hoskins, W. M., & Craig, R. (1962). Uses of bioassay in entomology. Annual Review of Entomology, 7(1), 437-464.

9- Kahru, A., Tomson, K., Pall, T., & Külm, I. (1996). Study of toxicity of pesticides using luminescent bacteria Photobacterium phosphoreum. Water Science and Technology, 33(6), 147.

10- Kaksonen, A. H., Jussila, M. M., Lindström, K., & Suominen, L. (2006). Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. Soil Biology and Biochemistry, 38(4), 817-827.

11- Kelly, C. J., Tumsaroj, N., & Lajoie, C. A. (2004). Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system. Water Research, 38(2), 423-431.

12- Lakzian, A. (2009). Determination of toxicity threshold of zinc and copper for *E. coli* (as biosensor). Journal of Water and Soil. 23(1): 1-7 [Persian].

13- Laska, E. M., & Meisner, M. J. (1987). Statistical methods and applications of bioassay. Annual review of Pharmacology and Toxicology, 27(1), 385-397.

14- Laughlin, R., & Linden, O. (1983). Oil pollution and Baltic mysids: acute and chronic effects of the water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shrimp Neomysis integer. Marine Ecology Progress Series, 12, 29-41.

15- Lee, S. Y., Kang, H. J., & Kwon, J. H. (2013). Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. Ecotoxicology and environmental safety, 94, 116-122.

16- Leme, D. M., Grummt, T., Heinze, R., Sehr, A., Renz, S., Reinel, S., ... & Zocolo, G. J. (2012). An overview of biodiesel soil pollution: data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. Journal of Hazardous Materials, 199, 343-349.

17- Medvedeva, S. E., Tyulkova, N. A., Kuznetsov, A. M., & Rodicheva, E. K. (2009). Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria. Journal of Siberian Federal University, 4, 418-452.

18- Mohseni, M., Maghool, S. S. (2016). Toxicity assay of heavy metals Pb, Cd and Cu by luminescent bacterium isolated from the Caspian Sea. Journal of Cellular and Molecular Researches, 28(4), 588-598 [Persian].

19- Mohseni, M., Abbaszadeh, J., Maghool, S. S., & Chaichi, M. J. (2018). Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. Ecotoxicology and Environmental Safety, 148, 555-560.

20- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. Environment International, 32(2), 265-268.

21- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2008). Toxicity assessment of organic pollutants: reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. Toxicology in vitro, 22(7), 1806-1813.

22- Shamsipur, M., Yeganeh-Faal, A., Chaichi, M. J., Tajbakhsh, M., & Parach, A. (2007). A study of chemiluminescence from reaction of bis (2, 4, 6-trichlorophenyl) oxalate, hydrogen peroxide and an optical brightener 5-(3-anilino-5-chloroanilino)-2-{(E)-2-[4-(3-anilino-5-chloroanilino)-2-sulfophenyl]-1-ethenyl}-1-benzenesulfonic acid. Dyes and Pigments, 72(1), 113-118.

23- Spengler, J. D., & Sexton, K. (1983). Indoor air pollution: a public health perspective. Science, 221(4605), 9-17.

24- Smith, M. T., Zhang, L., McHale, C. M., Skibola, C. F., & Rappaport, S. M. (2011). Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology. Chemico-Biological Interactions, 192, 155-159.

25- Williams, P. L., & Burson, J. L. (1985). Industrial toxicology.Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 230-259.

Bioassay detection of some benzene derivatives using luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea

Mohseni M.,[1] Pourseyed S.F.[1] and Chaichi M.J.[2]

[1] Dept. of Microbiology, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Analytical Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran.

Running title: Bioassay detection of benzene derivatives using luminescent bacterium

Abstract

The presence of different organic pollutions including benzene and its derivatives in water and waste water has become a major concern. Cytotoxicity assay based on bacterial luminescence inhibition is a useful method for the detection of pollutants in the environment. The purpose of this study was the detection of some benzene derivatives using cytotoxicity assay based on luminescence inhibition of native *Vibrio* MM1 isolated from the Caspian Sea. In order to conduct the toxicity test, different concentration of some benzene derivatives was added individually to the growth culture of *Vibrio* MM1. The cytotoxicity of benzene derivatives was measured by considering the reduction of *Vibrio* MM1 luminescence using a luminometer. The results showed that the luminescent intensity of MM1 was significant reduced in the presence of benzene derivatives, so that a very low concentrations of benzene derivatives until 10^{-18} mgL^{-1} were measured. In addition, the EC_{50} value were measured 3.4×10^{-14} , 7.83×10^{-13}, 1.29×10^{-8}, 2.91×10^{-9}, 1.82×10^{-5}, 3.82×10^{-8}, 2.9×10^{-3} , 2×10^{-4}, and 8.3×10^{-3} mgL^{-1} for benzene, ethylbenzene, bromobenzen, chlorobenzen, aniline, chlorophenol, nitrobenzene, resorcinol and pyrocatechol, respectively. To evaluate the acute and chronic effects of benzene derivatives, $T_{1/2}$ parameter was calculated for each concentration. These results demonstrated that the concentration of 1.7×10^{-7} mgL^{-1} ethylbenzene and 1.9×10^{-8} mgL^{-1} nitrobenzene had the highest acute and chronic toxicity with the $T_{1/2}$ values of 15.6 and 471.9 seconds, respectively. The results of current study indicated that the native luminescent *Vibrio* sp. MM1 can be useful for detection and cytotoxicity assessment of environmental pollutants including benzene derivatives.

Key words: Benzene derivatives, toxicity assay, bioluminescence, *Vibrio* sp. MM1.