# شناسایی گونه باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها در خاک‌های آلوده به نفت خام اهواز

وحید سروی مغانلو[1]، مصطفی چرم[2]، حسین معتمدی[3]، حمیدرضا پورزمانی[4]، مرجان فلاح[5]

**مقاله پژوهشی**


## چکیده

**مقدمه:** استخراج بلند مدت و تولید مشتقات نفتی متنوع باعث گسترش آلودگی در خاک‌های اطراف مکان‌های استخراج و پالایش نفت می‌شود. بزرگ‌ترین نگرانی در این مورد، خطرات زیست محیطی این آلاینده‌ها می‌باشد. هدف مطالعه حاضر، شناسایی و جداسازی باکتری‌های بومی تجزیه کننده آلاینده‌های هیدروکربنی نفت در خاک‌های آلوده منطقه اهواز بود.

**روش‌ها:** بدین منظور از خاک‌های آلوده اطراف چاه‌های نفت مارون اهواز یک نمونه مرکب خاک تهیه شد و یک نمونه خاک غیر آلوده نیز از مناطق فوق تهیه و به شکل مصنوعی با نفت خام در سطح ۵ درصد آلوده گردید. شمارش باکتری‌های تجزیه کننده نفت به روش بیش‌ترین تعداد احتمالی (Most probable number یا MPN) صورت گرفت و در مرحله بعد غنی‌سازی و خالص‌سازی باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط آگار مغذی انجام شد. از تست‌های افتراقی و رنگ‌آمیزی گرم برای شناسایی خانواده و یا جنس گونه‌های جداسازی شده استفاده گردید.

**یافته‌ها:** تعداد باکتری‌های تجزیه کننده در خاک آلوده طبیعی $۶/۸ \times ۱۰^{۵}$ و در خاک آلوده به روش مصنوعی برابر با $۳/۵ \times ۱۰۷$ شمارش گردید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج جداسازی نشان داد که در خاک آلوده طبیعی باکتری‌های تجزیه‌گر شامل جنس‌های استافیلوکوکوس، اسینتوباکتر و فلاووباکتریوم هستند و در خاک با سطح آلودگی ۵ درصد باکتری‌های تجزیه‌گر متعلق به جنس‌های اسینتوباکتر، سودوموناس و مورکسلا می‌باشند.


**واژه‌های کلیدی:** MPN، باکتری تجزیه‌گر نفت، آلودگی نفتی، تجزیه بیولوژیکی

**ارجاع:** سروی مغانلو وحید، چرم مصطفی، معتمدی حسین، پورزمانی حمیدرضا، فلاح مرجان. **شناسایی گونه باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌ها در خاک‌های آلوده به نفت خام اهواز.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۱؛ ۸ (۶): ۱۱۰۶-۱۰۹۸.

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۸/۲۵

Archive

## مقدمه

آلودگی محیط زیست در بسیاری از جوامع امروزی به یکی از چالش‌های مهم و نگران کننده تبدیل شده است. انسان در اثر فعالیت‌های روزمره خود مقادیر قابل توجهی از آلاینده‌ها را به منابع آب و خاک وارد می‌سازد که باعث ایجاد تغییرات قابل ملاحظه و مشهود در محیط زیست می‌شود. یک دسته از این آلاینده‌ها، آلاینده‌های نفتی است که برخی از آن‌ها دوام بالایی دارند و وجود آن در خاک احتمال انتقال آن به منابع آب را به دنبال دارد (۱). استخراج بلند مدت و تولید مشتقات نفتی متنوع باعث گسترش آلودگی در خاک‌های اطراف

۱- دانشجوی دکتری، گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (نویسنده مسؤول)
Email: vsarvi@gmail.com
۲- دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴- دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی، مؤسسه تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. اصفهان، ایران
۵- کارشناسی ارشد، گروه محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات اهواز، اهواز، ایران



www.SID.ir
www.mui.ac.ir

مکان‌های استخراج و پالایش شده است. بزرگ‌ترین نگرانی در مورد این آلاینده‌ها، خصوصیات سمیت‌زایی، جهش‌زایی و سرطان‌زایی می‌باشد (۲). روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای اصلاح خاک‌های آلوده وجود دارد، اما در این بین با توجه به هزینه بالای روش‌های فیزیکوشیمیایی و عوارض جانبی آن‌ها، استفاده از روش‌های بیولوژیکی (زیست پالایی) در اولویت قرار گرفته است (۳). در بین روش‌های مختلف زیست پالایی، زیست پالایی درجا که بر میکروفلور بومی خاک‌های زیر سطحی و آب‌های زیرزمینی متکی است از کم‌هزینه‌ترین و باصرفه‌ترین روش‌ها می‌باشد. در واقع میکروارگانیسم‌های موجود در محل با مواد آلی زاید سازگاری یافته و قادر هستند بخشی و یا همه اجزای مواد آلی زاید را تجزیه کنند، اما در حالت عادی به دلیل عوامل محدود کننده مانند کاهش مواد غذایی و یا کاهش میزان اکسیژن میزان باکتری‌های تجزیه کننده کاهش می‌یابد (۲).

از راهکارهای تشدید کننده این تجزیه می‌توان به تحریک باکتری‌های تجزیه‌گر به واسطه افزودن عناصر غذایی مورد نیاز آن‌ها و تقویت بیولوژیکی که شامل اضافه کردن باکتری‌های تجزیه‌گر بومی و غیر بومی است اشاره کرد (۴). در مورد راهکار اول، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که برای کاهش قابل ملاحظه آلاینده‌ها نیاز به مصرف مقدار بالای عناصر غذایی و چندین بار هوادهی می‌باشد. مطالعات Ayotamuno و همکاران نشان داد که کاربرد ۱۸/۷۵ تن در هکتار کود شیمیایی عناصر NPK (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) باعث کاهش ۶۳ درصد آلاینده‌های هیدروکربنی و کاربرد ۱۲/۵ تن در هکتار باعث کاهش ۸۲ درصد آلاینده‌های هیدروکربنی می‌شود (۵). نکته‌ای که در این‌جا حایز اهمیت است آن که اگر چه حذف آلاینده‌های هیدروکربنی در حد قابل ملاحظه‌ای صورت گرفته است، اما مصرف بالای کودهای شیمیایی خود می‌تواند منشأ آلودگی آب‌های زیرزمینی شود. مکانیسم دوم که به تازگی به عنوان بهترین روش اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی معرفی شده است (۶)، در مورد نحوه تجزیه ترکیبات آلی از جمله هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌ها، باکتری‌های تجزیه‌گر هیدروکربن‌های نفتی با توجه به حلالیت پایین هیدروکربن‌ها دارای دو مکانیسم برای بالا بردن تجزیه آلاینده‌ها می‌باشند. اولین راهکار، تولید جاذب‌های سطحی بیولوژیکی می‌باشد که باعث افزایش حلالیت و قابلیت دسترسی باکتری‌ها به آلاینده‌ها می‌شود و به عبارت بهتر به امولسیون بهتر هیدروکربن‌ها کمک می‌کند. راهکار دوم توسط مکانیسم اتصال/ تخریب می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعات موجود، اکثر باکتری‌های تجزیه‌گر قدرت جذب سطحی هیدروکربن‌ها را دارند که به آن‌ها امکان تماس فیزیکی مناسب با هیدروکربن‌ها را می‌دهد. به عبارت دیگر، باکتری‌ها با داشتن سطح سلولی آب‌دوست که برای اتصال بهینه به آلاینده‌ها مؤثر است، می‌توانند ترکیبات سنگین را به ذرات ریز تبدیل کرده و به عنوان منبع کربن از آن استفاده کنند (۷). بنابراین این روش می‌تواند با کمترین عوارض جانبی بیشترین راندمان را در اصلاح خاک‌های آلوده ایفا کند. در ضمن بر عکس روش‌های دیگر که دارای تأثیر کوتاه مدت هستند، دارای تأثیر دایمی می‌باشند که مهم‌ترین جنبه مثبت این مکانیسم است (۸).

مطالعات مختلفی در این زمینه در نقاط مختلف جهان که دارای مشکل آلودگی خاک‌ها با هیدروکربن‌های نفتی هستند، صورت گرفته است. برای مثال بر اساس یافته‌های اطلس (۹) باکتری‌های مایکوباکتریوم، آسفیلنوماس و رودوکوکوس به عنوان باکتری‌های تجزیه‌گر نفت معرفی شدند، اما با توجه به شرایط آب و هوایی، خاک و ترکیبات آلاینده باکتری‌های تجزیه‌گر هر منطقه می‌تواند متفاوت باشد. از آن جمله می‌توان به مطالعات رحمان و همکاران در خاک‌های آلوده هند با شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب اشاره کرد که باکتری‌های اسینتوباکتر و سودوموناس را به عنوان کارامدترین باکتری‌های تجزیه‌گر معرفی کردند (۱۰).

تخریب ضایعات گیاهی، حیوانی و انسانی به دلیل انتقال این توانایی از یک نسل به نسل بعد توسط موجودات زنده ذره‌بینی در طی سالیان متمادی و درازمدت در خاک برقرار بوده و خواهد بود. بدون فعالیت موجودات زنده ذره‌بینی، زمین و خاک به طور قطع توسط این ضایعات از بین می‌رفتند و



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

عناصر غذایی مورد نیاز اکثر گیاهان در گرو فعالیت این ریزجانداران می‌باشد. اگر چه موجودات زنده ذره‌بینی در تخریب آلاینده‌های حاصل از فعالیت انسان کارا می‌باشند، اما در کل تخریب این آلاینده‌ها به سه عامل: نوع موجودات زنده ذره‌بینی، نوع آلاینده‌ها و شرایط شیمیایی و ژئولوژیکی منطقه آلوده وابسته است (۸). بنابراین با توجه به اهمیت موضوع، نخستین قدم در استفاده از این سیستم زیست پالایی جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی می‌باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی جمعیتی، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌گر هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده اهواز بود.

## روش‌ها

برای انجام این آزمایش از دو نمونه خاک استفاده شد. نمونه اول از خاک‌های آلوده اطراف چاه‌های نفت مارون بود و نمونه دوم از خاک‌های کشاورزی غیر آلوده همان منطقه انتخاب شد که با اسپری کردن نفت خام آلودگی آن به سطح ۵ درصد رسید. برای انجام این کار نفت خام با نسبت ۵:۱ با استون مخلوط شده و به طور یکنواخت در سطح خاک اسپری شد و برای تکمیل فرایند جذب سطحی و توزیع یکنواخت به مدت یک ماه در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید و طی این مدت خاک‌ها در حد رطوبت ظرفیت زراعی آبیاری و به طور کامل زیر و رو و مخلوط شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد آزمایش از قبیل بافت خاک، کربن آلی، نیتروژن کل، ظرفیت تبادل کاتیونی، هدایت الکتریکی و میزان عناصر غذایی Ca، K، P، N و Mg با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین گردیدند (۱۱).

باکتری‌های تجزیه‌گر نمونه خاک‌ها به روش بیشترین تعداد احتمالی (Most probable number یا MPN) و با استفاده از محیط کشت بوشنل‌هاس (Bushnell-Haas) که طبق روش ونوسا و ورن تهیه گردیده بود (سولفات منیزیم ۰/۲ گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۲ گرم بر لیتر، منوفسفات پتاسیم ۱ گرم بر لیتر، فسفات دی‌آمونیوم ۱ گرم بر لیتر، نیترات پتاسیم ۱ گرم بر لیتر، کلرید فریک ۰/۵ گرم بر لیتر، ۲ درصد وزنی کلرید سدیم با pH = ۷/۲)، شمارش شد (۵). ۵ گرم از نمونه خاک با ۴۵ میلی‌لیتر از محیط کشت بوشنل‌هاس مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد (رقت $10^{-1}$)، سپس از این رقت سوسپانسیون خاک تا رقت $10^{-6}$ تهیه گردید. با سه تکرار، ۵ میلی‌لیتر از هر رقت را در لوله آزمایش ریخته و ۰/۲ میلی‌لیتر نفت خام استریل شده و چند قطره معرف رسازورین (Resazorin) (۱ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در حال شیک مداوم انکوبه شدند. بعد از طول دوره انکوباسیون، لوله‌های تغییر رنگ داده را به عنوان نمونه مثبت (رشد باکتری‌ها) و عدم تغییر رنگ داده را به عنوان نمونه منفی در نظر گرفته و با استفاده از جدول MPN تعداد باکتری‌های تجزیه‌گر به دست آمد (۱۲).

جهت جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌گر نفت، بدین منظور از رقت $10^{-3}$ که طبق روش فوق از سوسپانسیون $10^{-1}$ تهیه شد، استفاده گردید؛ بدین صورت که ۱۵ میلی‌لیتر از این رقت را در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۰/۴ میلی‌لیتر از نفت خام استریل شده به آن اضافه شد و به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در حال شیک مداوم انکوبه شد. پس از این دوره، نمونه را تا رقت $10^{-5}$ رقیق کرده و از سه رقت آخری ۰/۱ میلی‌لیتر را به پتری دیش انتقال داده و ۲۰ میلی‌لیتر آگار مغذی غنی‌سازی شده با نفت خام به آن اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این دوره کلونی‌های مجزا از لحاظ شکل و ریخت ظاهری برای خالص‌سازی به روش کشت چهار منطقه‌ای بر روی محیط کشت جداگانه کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. برای شناسایی خانواده و جنس باکتری‌های جداسازی شده از تست‌های افتراقی شامل تست‌های اکسیداز، کاتالاز، تولید ایندول، تخمیر قندها، رشد بر روی محیط مک‌کانکی (MacConkey)، تحرک، مصرف سیترات، ذوب کردن ژلاتین، رشد در کلرید سدیم ۶/۵ درصد، تولید $H_2S$ در محیط سه قندی آهن‌دار (Triple sugar iron یا TSI)، واکنش در محیط متیل (Vogesproskaure) (MR-VP) و رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. برای تجزیه



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

آماری داده‌ها نیز از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون ANOVA استفاده گردید.

## یافته‌ها

### الف) مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه خاک‌ها

مشخصات فیزیکوشیمیایی نمونه خاک‌ها (جدول ۱) بیانگر این نکته است که هر دو خاک جزء خاک‌های شور می‌باشد. از لحاظ عناصر غذایی مورد نیاز میکرواگانیسم‌ها میزان Ca، Mg و K خاک آلوده طبیعی دارای مقادیر بالایی نسبت به خاک غیر آلوده است، اما از لحاظ میزان دو عنصر N و P که ضروری‌ترین عنصر مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها برای انجام فعالیت می‌باشد خاک آلوده طبیعی دارای مقادیر پایینی از این عناصر می‌باشد.

**جدول ۱: مشخصات فیزیک و شیمیایی نمونه خاک‌ها**

| خصوصیات فیزیکی و شیمیایی | خاک آلوده طبیعی | خاک آلوده مصنوعی |
|---|---|---|
| بافت خاک | لومی | لومی |
| pH | ۷/۸۰ | ۸/۷ |
| CEC (meq/۱۰۰gr) | ۱۰/۰۰ | ۹/۵ |
| EC (ds/m-۱) | ۴/۷۰ | ۸/۲ |
| Ca (meq/l-۱) | ۵۰/۰۰ | ۱۹/۵ |
| Na (meq/l-۱) | ۲۲۲/۰۰ | ۵۸/۲ |
| K (meq/l-۱) | ۴۰/۳۰ | ۱۶/۹ |
| P (mgr/kg-۱) | ۲/۷۰ | ۴/۰ |
| Mg (meq/l-۱) | ۲۰/۰۰ | ۱۸/۰ |
| N (درصد) | ۰/۱۵ | ۰/۵ |
| TOC (kg/mgr-۱) | ۳/۵۰ | ۱/۲ |

CEC: Capacity exchange cation
TOC: Total organic carbon

### ب) شمارش باکتری‌های تجزیه‌گر

نتایج شمارش باکتری‌های تجزیه‌گر به روش MPN نشان داد که تعداد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده طبیعی $۶/۸ \times ۱۰^{۴}$ و در خاک آلوده شده با سطح آلودگی ۵ درصد $۳/۵ \times ۱۰^{۷}$ می‌باشد.

### ج) شناسایی باکتری‌های تجزیه‌گر

مقایسه نتایج به دست آمده با کلید واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها به تست‌های افتراقی نشان داد که از چهار باکتری شناسایی شده در خاک آلوده طبیعی، دو گونه ($A_۱$ و $A_۲$) با توجه به تفاوت در مورفولوژی و پاسخ به برخی از تست‌ها از باکتری‌های جنس اسینتوباکتر در حالی که یک گونه ($A_۳$) متعلق به باکتری‌های جنس استافیلوکوکوس بوده و گونه ($A_۴$) متعلق به باکتری‌های جنس فلاووباکتریوم می‌باشد. در مورد نمونه خاک آلوده مصنوعی با سطح آلودگی ۵ درصد نتایج نشان داد که از سه گونه باکتری جداسازی شده با توجه به نتایج پاسخ آن‌ها به تست‌های افتراقی باکتری با مورفولوژی کوکسی ($B_۲$) متعلق به جنس اسینتوباکتر و نوع ($B_۳$) متعلق به جنس مورکسلا و باکتری‌های با مورفولوژی میله‌ای ($B_۱$) متعلق به جنس سودوموناس بودند. نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها به تست‌های افتراقی در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

## بحث

نتایج مربوط به شمارش باکتری‌ها را می‌توان با دو فرضیه توجیه کرد. نخست با توجه به این‌که هر دو نمونه از مکان‌های با شرایط مشابه از لحاظ آب و هوایی تهیه شده بود، بالا بودن شمار باکتری‌های تجزیه‌گر در خاک آلوده مصنوعی می‌تواند ناشی از استرس اکولوژیکی به وجود آمده در اثر اضافه شدن هیدروکربن‌های نفتی باشد که می‌تواند به عنوان یک منبع جدید کربن برای میکروارگانیسم‌های خاک تلقی گردد (۱۳). Caravaca و Roldan (۲) نیز نتایج مشابهی را در مورد شمار باکتری‌های تجزیه‌گر بلافاصله بعد از افزودن ترکیبات نفتی مشاهده کردند. در مورد شمار باکتری‌های تجزیه‌گر خاک‌های آلوده طبیعی نیز چنین می‌توان فرض کرد، با توجه به این‌که آلودگی این خاک‌ها مربوط به زمان گذشته است و با توجه به پایین بودن ماده آلی خاک‌های منطقه، ذرات خاک تمایل زیادی به جذب ترکیبات فوق در ماتریکس خاک دارند که این امر باعث کاهش قابلیت دسترسی ترکیبات هیدروکربنه برای میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبع هیدروکربنه می‌شود (۱). از دلایل دیگر پایین بودن جمعیت باکتری‌های تجزیه‌گر می‌توان به کاهش تهویه



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

جدول ۲: نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌گر به تست‌های افتراقی در خاک آلوده طبیعی

| Acid in O-F Glucose | Acid in O-F lactose | NO3- reduction | TSI | Gelatin liquefaction | Growth in NaCl 6.5% | Methyl red | citrate | Indole production | Growthon mac canky | Motility | oxidaze | catalase | Cell morphology | Gram staining | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | - | - | Alk-Alk | - | | + | - | - | + | - | - | + | Cocci | - | A1 |
| - | + | - | Acid-Alk | - | | - | - | - | + | - | - | + | Cocci | - | A2 |
| + | - | - | Acid-Acid | - | + | - | - | - | - | + | - | + | Baccil | + | A3 |
| - | - | - | Alk-Alk | - | | - | + | + | - | + | + | + | Rod | - | A4 |

جدول ۳: نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌گر به تست‌های افتراقی در خاک با سطح آلودگی ۵ درصد

| Acid in OF Glucose | Acid in O-F lactose | NO3- reduction | TSI | H2S in TSI | Gelatin liquefaction | Methyl red | citrate | Indole production | Growthon mac canky | Motility | oxidaze | catalase | Cell morphology | Gram staining | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| - | - | − | Alk-Alk | - | - | - | + | - | + | + | + | + | Rod | - | B1 |
| - | + | - | Alk-Alk | - | - | - | + | - | + | + | − | + | Cocci | - | B2 |
| - | unreactive | + | Alk-Alk | - | - | + | - | + | + | - | + | + | Cocci | - | B3 |



www.SID.ir

www.mui.ac.ir

خاک ناشی از طبیعت ترکیبات هیدروکربنه (به خاطر مشخصات آب‌دوستی هیدروکربن‌ها و محدودیت توزیع اکسیژن بین آن‌ها) اشاره کرد (۴). از طرف دیگر ورود نفت در خاک به علت وارد کردن مقادیر عظیم کربن آلی باعث ایجاد نسبت بزرگ C/N می‌شود که با گذشت زمان باعث می‌شود نیتروژن معدنی موجود در خاک به صورت آلی درآمده و در نتیجه میکروارگانیسم‌ها با کمبود نیتروژن روبرو شوند و به دلیل عدم تأمین ازت مورد نیاز، فعالیت و شمار میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر کاهش یابد (۱). با توجه به مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک‌ها مشاهده می‌کنیم که خاک آلوده طبیعی دارای نسبت C/N بزرگ‌تری بوده و برای انجام فرایند معدنی کردن کربن آلی نیاز به مصرف ازت می‌باشد.

بررسی متابولیسم غذایی باکتری‌های شناسایی شده در این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های اسینتوباکتر، مورکسلا، سودوموناس و فلاووباکتریوم دارای متابولیسم غذایی پیچیده نبوده و از اکثر ترکیبات آلی و غیر آلی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند، در واقع این باکتری‌ها با توجه به نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی به تست‌های افتراقی از طریق اکسیداسیون مواد آلی در دسترس کربن مورد نیاز خود را به دست می‌آورند. در این بین به طور معمول ابتدا ترکیبات با ساختار و پیوندهای ساده را مورد تجزیه و استفاده قرار می‌دهند و بعد از اتمام آن‌ها به سراغ ترکیبات سرسخت و سنگین می‌روند (۱۶-۱۴)؛ در حالی که استافیلوکوکوس نقش خود را در تجزیه آلاینده‌های هیدروکربنی به وسیله فرایند تخمیر انجام می‌دهد، در واقع در این فرایند آلاینده‌های آلی نقش گیرنده و دهنده الکترون را یک جا ایفا می‌کند و در اثر این عمل آلاینده‌ها به ترکیبات مثل استات، اتانول، دی‌اکسید کربن و هیدروژن تبدیل می‌شوند (۱۴).

از نظر اکولوژی پراکنش باکتری‌ها، اسینتوباکتر و استافیلوکوکوس در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی یافت می‌شوند و قدرت تحمل خشکی‌های بالا و درازمدت و همچنین pH بالا را دارند؛ در حالی که مورکسلا و سودوموناس اغلب در PHهای ۸-۴ یافت می‌شوند، فلاووباکتریوم نیز جزء باکتری‌هایی است که وجود آن در محیط‌های شور اعم از خاک و یا آب‌های سطحی و زیرزمینی گزارش شده است (۱۶، ۱۴). از نظر شرایط دمایی نیز به جز فلاووباکتریوم که فقط وجود گونه‌های معدودی از آن در مناطق گرم و خشک گزارش شده است، باکتری‌های اسینتوباکتر، مورکسلا، سودوموناس و استافیلوکوکوس در طیف وسیعی از دما (۴۲-۴ درجه سانتی‌گراد) توانایی زندگی را دارند. تفاوت بین نوع باکتری‌های تجزیه‌گر دو خاک نیز می‌تواند ناشی از تفاوت شرایط فیزیکوشیمیایی خاک‌ها از قبیل PH، EC و تهویه خاک (۷) و یا استرس اکولوژیکی متفاوت به وجود آمده در دو نمونه خاک آلوده طبیعی و مصنوعی ناشی از ورود ترکیبات نفتی به خاک باشد (۲).

اگر چه ساختار میکروبی، جمعیت و تنوع میکروارگانیسم‌های خاک یک منطقه با توجه به شرایط منطقه چه از لحاظ اقلیم و شرایط غالب خود خاک متفاوت است، با این حال بر اساس مطالعات صورت گرفته، محققان باکتری‌های رودوکوکوس، مایکوباکتریوم، آلکالیژنز، سودوموناس، بیژرینکا، استافیلوکوکوس، آرتروباکتر، نوکاردیا و اسینتوباکتر را به عنوان کارامدترین باکتری‌های تجزیه‌گر ترکیبات سنگین نفت معرفی کردند (۱۷). مطالعات زیادی در مورد شناسایی باکتری‌های تجزیه‌گر هیدروکربن نفتی صورت گرفته است که بر اساس آن باکتری‌های تجزیه‌گر به طور عمده متعلق به جنس‌های باسیلوس، میکروکوکوس، مورکسلا، اسینتوباکتر و سودوموناس می‌باشند. در این بین سودوموناس بیشترین توانایی و قدرت را در تولید جاذب‌های سطحی بیولوژیکی و بالا بردن حلالیت ترکیبات آلاینده‌های سنگین داشت، از این لحاظ اسینتوباکتر در رتبه بعد قرار داشت و کمترین قدرت تولید مربوط به میکروکوکوس بود؛ در حالی که بیشترین قدرت جذب سطحی آلاینده‌ها مربوط به باکتری‌های جنس سودوموناس و آلکالیژنز می‌باشد. مطالعات Saadoun در شمال غربی اردن با آب و هوای گرم و خشک نشان داد که باکتری‌های سودوموناس، اسینتوباکتر و انتروباکتریاسه بیشترین قدرت تخریب و تجزیه آلاینده‌ها را داشتند (۱۸).



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

بر اساس مطالعات Ramsay و همکاران اعلام شد که اسینتوباکتر مانند سودوموناس به خاطر توانایی بالا در تولید جاذب‌های سطحی بیولوژیکی ابزار مناسبی برای رفع آلاینده‌های هیدروکربنی در مکان‌های صنعتی می‌باشند (۱۲). همچنین بر اساس گزارش‌های اعلام شده مورکسلا، سودوموناس و فلاووباکتریوم از توانایی بالایی در متابولیزه کردن دامنه وسیعی از سوبستراها شامل ترکیبات شیمیایی مثل آلیفاتیک‌ها و آروماتیک‌ها را دارند و قدرت تحمل غلظت بالای عناصر سنگین و سمی را دارند (۱۶).

## نتیجه‌گیری

اگر چه باکتری‌های جداسازی شده قابلیت خوبی را در تجزیه ترکیبات نفتی در محیط کشت بوشنل‌هاس از خود نشان دادند و با توجه به شرایط زندگی آن‌ها –که قدرت تحمل بالایی در مقابل خشکی و تنش‌های محیطی دارند– می‌توان انتظار داشت که در فرایند زیست پالایی خاک‌های آلوده و در صورت مدیریت مناسب بازدهی مناسبی از خود نشان دهند، با این وجود پیشنهاد می‌گردد با استفاده از روش‌های شناسایی DNA جنس باکتری‌های تجزیه‌گر شناسایی و توانایی آن‌ها در تولید جاذب‌های سطحی بیولوژیکی و قدرت جذب سطحی آلاینده‌ها توسط این باکتری‌ها در شرایطی مشابه منطقه (از لحاظ pH و غلظت عناصر غذایی) بررسی گردد و از کارامدترین آن‌ها برای زیست پالایی استفاده گردد.

## تشکر و قدردانی

در پایان لازم می‌دانم از زحمات مهندس ترکمان اسدی به عنوان مشاور صنعتی و از حمایت مالی شرکت ملی مناطق نفت‌خیز جنوب (شهید تندگویان) از این طرح کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

## References

1. Rivera-Espinoza Y, Dendooven L. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. Chemosphere 2004; 54(3): 379-86.
2. Caravaca F, Roldan A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. Geoderma 2003; 117(1-2): 53-61.
3. Shabir G, Afzal M, Anwar F, Tahseen R, Khalid ZM. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 2008; 61(2): 161-6.
4. Schaefer M, Juliane F. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. Applied Soil Ecology 2007; 36(1): 53-62.
5. Ayotamuno MJ, Kogbara RB, Ogaji SOT, Probert SD. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria. Applied Energy 2006; 83(11): 1249-57.
6. Khalid ZM, Abdol M. Successful aplication of bioremediation for decontaminated of oil contamination Karachi seashure. Development Pakistan 2005; 2: 1211-7.
7. Yuste L, Corbella ME, Turiegano MJ, Karlson U, Puyet A, Rojo F. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. FEMS Microbiol Ecol 2000; 32(1): 69-75.
8. Schwab AP, Banks M. Biologically mediated dissipution of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In: Anderson TA, Coats JR, Editors. Bioremediation through rhizosphere technology. Washington, DC: American Chemical Society; 1994. p. 132-41.
9. Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol Rev 1981; 45(1): 180-209.
10. Rahman PK, Rahman TJ, Lakshmanaperumalsamy P, Marchant R, Banat IM. 'The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. Acta Biotechnologica 2003; 23(4): 335-45.
11. Page AL, Miller RH, Kcency DR. Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Biological Properties. 2nd ed. Madison, WI: American Society of Agronomy; 1982. p. 11-59.
12. Ramsay MA, Swannell RP, Shipton WA, Duke NC, Hill RT. Effect of bioremediation on the microbial



Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

community in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin 2000; 41(7-12): 413-9.
13. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York, NY: Springer; 2005.
14. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 3rd ed. New York, NY: Springer; 2006. p. 11-82. (vol 4).
15. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 3rd ed. New York, NY: Springer; 2006. p. 964-70. (vol 6).
16. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 3rd ed. New York, NY: Springer; 2006. p. 1240-59. (vol 7).
17. Singh H. Mycoremediation: Fungal Bioremediation. New Jersey, NJ: John Wiley & Sons p. 283-5; 2006.
18. Saadoun I. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. J Basic Microbiol. 2002; 42(6): 420-8.

Archive of SID



www.SID.ir
www.mui.ac.ir

# Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria Genus from Oil-Crude Contaminated Soils

**Vahid Sarvi Moghanlo[1], Mostafa Chorom[2], Hossien Motamedy[3], Hamidreza Pourzamani[4], Marjan Falah[5]**

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Long-term extraction and production of various oil derivatives causes contamination of soil adjacent to production and refining area. The main important issue is the ecological hazard of these pollutants. The main aim of the study was to identify and separate native bacteria that are responsible for degradation of oil contaminated fields.

**Methods:** We prepared a compound sample of contaminated soil in the vicinity of oil wells drilled in Marun oil field of Ahwaz, Iran. Moreover, an uncontaminated sample was picked from the same area and deliberately contaminated with crude oil in a 5 wt% rate. The number of oil degrading bacteria was counted by MPN (Most probable number) method. Then, the bacteria was cultured and isolated in a rich agar medium and late discrimination test was done by gram staining and biochemical tests at the level of family or genus.

**Findings:** The number of bacteria in naturally contaminated and artificially soil was $6.8 \times 10^5$ and $3.5 \times 10^7$, respectively. The majority of bacteria responsible for oil degradation were S*taphylococcus, Acinetobacter and Flavobacterium* genus in naturally contaminated soil; however, A*cinetobacter, Pseudomonas and Moraxella* genus were the main bacteria in artificially-contaminated soil samples.

**Conclusion:** It is recommended to be used for bioremediation of native organisms and bio-power and robust.

**Key words**: Most Probable Number, Oil Degrading Bacteria, Oil Contamination, Degrading Biological

**Citation:** Sarvi Moghanlo V, Chorom M, Motamedy H, Pourzamani H, Falah M. **Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria Genus from Oil-Crude Contaminated Soils.** J Health Syst Res 2013; 8(6): 1098-106.

Received date: 03/08/2012 Accept date: 15/11/2012

1- PhD Candidate, Department of Soil Engineering, School of Agriculture, University of Lorestan, Khoramabad, Iran (Corresponding Author) Email: vsarvi@gmail.com
2- Associate Professor, Department of Chemistry and Soil Pollution, School of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran
3- Assistant Professors, Department of Microbiology, School of Science, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran
4- PhD Candidate, Student Research Committee, Environmental Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Department of Environmental Management, Islamic Azad University, Ahwaz Science and Research Branch, Ahwaz, Iran



www.mui.ac.ir
www.SID.ir