Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۷۲- ۶۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از شکم‌پا *Haustrum scobina* جمع‌آوری شده از خلیج فارس (ناحیه ساحلی بندرعباس)

زینب بیات: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران، zeynabbayat167@gmail.com
مهدی حسن شاهیان *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران، hasanshahi@gmail.com
مجید عسکری حصنی: استادیار زیست شناسی دریا، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران، majidask@gmail.com

چکیده

مقدمه: تجزیه زیستی یک جایگزین خوب نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت است. عوامل متعددی بر تجزیه زیستی شامل: غلظت نفت خام، تولید بیوسورفکتانت، شوری و زمان انکوباسیون تاثیر می‌گذارند. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت از شکم‌پا و بررسی اثر تولید بیوسورفکتانت، غلظت‌های مختلف نفت، زمان انکوباسیون، کشت مخلوط و شوری بر تجزیه نفت توسط باکتری‌های تجزیه کننده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از آب و شکم‌پایان خلیج فارس نمونه‌برداری شد. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از نمونه‌های جمع‌آوری شده، محیط کشت ONR7a استفاده شد. سویه‌هایی که رشد و حذف نفت بالاتری داشتند انتخاب و شناسایی شدند. تولید بیوسورفکتانت، اثر غلظت‌های مختلف نفت، زمان انکوباسیون، کشت مخلوط و شوری بر میزان تجزیه زیستی بررسی شد.

نتایج: در مجموع ۶ کلونی که قادر به تجزیه نفت خام بودند، جداسازی شد. ۲ سویه بر اساس حذف نفت بیشتر و فعالیت امولسیون‌کنندگی بیشتر انتخاب شد. این سویه‌ها به جنس‌های *Vibrio* و *Halomonas* تعلق داشتند. فعالیت امولسیون‌کنندگی و میزان تجزیه نفت برای سویه *Vibrio alginolyticus* به ترتیب ۵۸/۴ و ۶۷/۵۸ درصد و برای سویه *Halomonas ps* به ترتیب ۱۱/۶و ۵۱/۴۴ درصد بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت سویه‌هایی که دارای فعالیت امولسیون‌کنندگی بیشتری می‌باشند، بیوسورفکتانت بیشتری تولید کرده و قابلیت حذف نفت بالاتری دارند. میزان رشد و تجزیه نفت با طولانی شدن دوره انکوباسیون، افزایش یافته است. همچنین، مشاهده شد کشت مخلوط سویه‌های *Vibrio* و *Halomonas* میزان بالاتری از تجزیه را نسبت به کشت آن‌ها به تنهایی دارد و با افزایش غلظت نفت از ۲/۵ درصد به بعد میزان رشد باکتری و تجزیه نفت کاسته شده است. بهینه رشد این سویه در ۲۰ تا ۸۰ گرم در لیتر سدیم‌کلرید است و در غلظت‌های بالاتر نمک، میزان رشد کاهش یافته است.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی‌های انجام شده نشان داد که باکتری‌های موجود در خلیج فارس از تنوع زیاد با توان تجزیه نفت بالا برخوردار هستند و می‌توان از آن‌ها برای پاک‌سازی مناطق دریایی آلوده به نفت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، شکم پا، باکتری تجزیه کننده نفت

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/BY-NC-ND/4. 0/) , which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

روش‌های حذف آلودگی‌های نفتی در آب، خاک و هوا به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی انجام می‌شود. از میان روش‌های فیزیکی می‌توان به ابزارهای جمع‌آوری کننده نظیر اسکیمر اشاره کرد. در روش شیمیایی اکسیدکننده‌های شیمیایی به محیط افزوده می‌شوند که پرهزینه‌اند و می‌توانند به تولید مواد جانبی خطرناک‌تر منجر شوند (۱). روش‌های زیستی نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی در حذف نفت مزایایی دارند، به طوری که امکان تجزیه زیستی درونی نفت به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌سازند. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده موثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکی- شیمیایی است. مکانیسم کلی تجزیه زیستی به این شکل است که میکروب‌ها و باکتری‌ها به قطرات نفتی حمله‌ور شده و پس از در بر گرفتن آن‌ها (به اصطلاح خوردن قطرات)، تجزیه و هضم اجزا آغاز شده و در نهایت، آب و گازهای بی‌خطری چون دی‌اکسیدکربن حاصل می‌شود (۲). میکروارگانیسم از مهم‌ترین عوامل تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی بوده و عملکرد آن‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی است. برای دستیابی به کارایی بالای تجزیه زیستی، شناخت شرایط بهینه مصرف این ترکیبات توسط باکتری‌های خالص‌شده مهم است (۳).

پژوهش‌های کمی به ارتباط بین موجودات پریاخته پیچیده مثل نرم‌تنان و پروکاریوت‌ها در اکوسیستم‌های آلوده پرداخته‌اند. نرم‌تنان اعماق دریا به طور مستقیم از رسوبات تازه ته‌نشین شده تغذیه و زندگی می‌کنند و بنابراین، در تماس مستقیم با مواد آلوده کننده وارد شده به آب هستند و از طرفی با واسطه معلق‌خواری با باکتری‌های جمع شده در رسوبات آلوده شوند. در واقع، حجم زیادی از آب را برای تامین مواد غذایی مورد نیازشان فیلتر و اجزای محلول نفتی و ذرات حاوی هیدروکربن‌های موجود در ستون آب‌های آلوده به نفت را جمع‌آوری می‌کنند. همچنین، ممکن است روی باکتریوپلانکتون ها در ستون آب نیز تاثیر گذارند (۴). شکم‌پایان از جمله موجوداتی هستند که باکتری‌ها در آبشش آن‌ها حضور دارند و ترکیبات کاهش یافته مانند هیدروژن سولفید را متابولیزه و کربن غیر آلی را به کربن آلی تثبیت می‌کنند که ممکن است به‌وسیله میزبان استفاده شود (۵).

هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در برخی شکم‌پایان خلیج فارس، بررسی تنوع جنس و گونه‌ای در باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام همراه با شکم‌پا و بررسی برخی عوامل محیطی بر میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه‌های بومی دریایی جداسازی شده از خلیج فارس است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، نمونه‌های آب دریا و شکم‌پا *Haustrum scobina* در اسکله حقانی قشم جمع‌آوری شد (شکل ۱). نمونه آب دریا از عمق ۱۵ سانتی‌متری و شکم‌پا نیز از مناطق ساحلی که احتمال حضور نفت وجود داشت و همچنین، از عمق ۱۰ تا ۱۵ متری به‌وسیله غواصی جمع‌آوری، در ظروف استریل و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و سپس، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام تحلیل‌های بعدی قرار داده شد (۶).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- *Haustrum scobina*

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت: برای جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط کشت اختصاصی ONRبا ۱ درصد نفت خام استفاده شد. از نمونه‌های آب به میزان ۵ میلی‌لیتر و محلول شکم‌پا ۵ میلی‌لیتر به داخل این محیط برای غنی‌سازی اولیه تلقیح شد. پس از دو پاساژ متوالی کلونی‌ها روی محیط کشت مارین آگار خالص‌سازی شدند. سویه‌های باکتریایی که بیش‌ترین چگالی نوری (OD) در ۶۰۰ نانومتر داشتند برای شناسایی غربال‌گری شدند. ترکیبات محیط ONR در یک لیتر به شرح زیر است: محلول اول شامل: سدیم‌کلرید (۴۰ گرم)، سدیم سولفات (۳/۸ گرم)، سدیم بی کربنات (۰/۰۳۱ گرم)، پتاسیم کلرید (۰/۷۲ گرم)، سدیم برمید (۰/۰۸۳گرم)، سدیم فلورید (۰/۰۰۲۶ گرم)، سدیم مونوفسفات (۰/۰۸۹ گرم)، اسید بوریک (۰/۲۷ گرم) و آمونیوم کلرید (۰/۲۷ گرم) و محلول دوم شامل کلسیم کلرید (۱/۴۶ گرم)، منیزیم کلرید (۱۱/۱۸ گرم)، استرانسیوم کلرید (۰/۰۲۴ گرم)، آهن کلرید (۰/۰۰۲گرم) و تریس (۱/۳ گرم) است. اسیدیته محلول در ۷/۶ تنظیم شد (۷).

برای شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از منابع یاد شده، از آزمایش‌های اولیه زیر رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل کلونی، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، اکسایش/ تخمیر (O/F)، احیای نیترات، تولید H_2S، تولید اندول و آزمون TSI استفاده شد (۸).

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی با تکثیر قسمتی از ژن *16S rDNA* توسط پرایمرهای عمومی
Forward Primer:
5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'و
Reverse Primer:
5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT -3'
انجام شد (۷). برنامه PCR برای تکثیر ژن به این شکل بود: دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ است. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس، باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگاروز طبق دستورکار کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست و همولوژی آن‌ها بررسی شد و نزدیکی بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ شد (۹).

سنجش حذف نفت خام توسط باکتری‌های جدا شده

روش اسپکتروفتومتری: میزان حذف نفت خام به‌وسیله حل کردن مقدار نفت باقیمانده محیط کشت در دی کلرو متان و سپس، خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد (محیط کشت ONR حاوی یک درصد نفت بدون تلقیح باکتری) در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

روش گاز کروماتوگرافی[1] (GC): سویه ها در محیط کشت ONR حاوی ۱ درصد نفت به مدت ۱۵ روز انکوبه شدند. پس از دوره انکوباسیون به محیط کشت ۵۰ میلی‌لیتر DCM افزوده و به قیف جداکننده برای جداسازی فاز آلی از فاز آبی منتقل شد. سپس، فاز آلی که حاوی نفت حل شده در DCM بود، درون ارلن ریخته، ۳ گرم سدیم سولفات برای جذب آب باقی مانده به ارلن اضافه و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد و در دمای محیط برای تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM، دوباره ۳ میکرولیتر DCM به یک میکرولیتر نفت باقی مانده اضافه شد و با دستگاه **GC** تحلیل شد (۱۱).

برنامه GC به این شکل بود:

ستون: varian capillary column cp- sil5cB (30 m ×0.32 mm × 0.1 µm) دتکتور:FID، گاز حامل: هلیم، دمای اولیه: ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای انتقال: ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق: ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نگهداری ستون: ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه سپس، ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، دمای نهایی: ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و جریان عبوری ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پیک‌های حاصل از GC با شاهد مقایسه و درصد تجزیه برای هر سویه محاسبه شد.

سنجش هیدروفوبیسیته سطح سلولی[2] (BATH): ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در بافر تهیه شد. ترکیبات بافر به شرح زیر است (گرم بر لیتر):

۲۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، ۲۲ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، ۷/۲۶ گرم اوره و ۰/۲ گرم منیزیم سولفات ($MgSO_4.7H_2O$).

سپس، ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکربن هگزا دکان به آن اضافه شده و پس از ۲ دقیقه همزنی، ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا فاز هیدروکربنی جدا شود. کدورت فاز آبی قبل و پس از تیمار اندازه گیری شد. نتایج به شکل جذب فاز آبی پس از تیمار نسبت به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی محاسبه شد (۱۲).

فعالیت امولسیونه کنندگی[3] (E_{24}): باکتری‌های تجزیه کننده ابتدا در محیط نوترینت براث به همراه ۴ درصد نمک کشت داده شدند و پس از آن که باکتری‌ها به رشد لگاریتمی رسیدند، میزان ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت درون لوله آزمایش حاوی ۶ میلی‌لیتر از نفت سفید استریل ریخته و با سرعت بالا همزنی شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت به شکل ساکن در دمای محیط قرار داده شد، پس از ۲۴ ساعت فعالیت امولسیونه‌کنندگی با فرمول ۱ به دست آمد (۱۳).

$$E_{24}= \frac{\text{ارتفاع ناحیه امولسیون شده}}{\text{کل ارتفاع مایع}} \times 100$$

فرمول ۱- فعالیت امولسیون کنندگی

آزمون هالوفیته: باکتری‌ها از نظر هالوفیل یا هالوترانت بودن و همچنین، غلظت بهینه نمک آزمایش شدند. برای این منظور کشت ۴۸ ساعته از باکتری‌ها در محیط مارین براث تهیه و کدورت‌شان با خواندن جذب نوری (OD600=2) تعیین شد. سپس، به محیط ONR حاوی ۱ تا ۲۰۰ گرم در لیتر سدیم‌کلرید و بدون سدیم‌کلرید تلقیح و در انکوباتور گذاشته شد. رشد باکتری‌ها از نظر ایجاد کدورت در محیط کشت بررسی شد (۱۴).

اثر غلظت: سویه‌های *Halomonas sp. isolate BHA16* و *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*

www.SID.ir

Archive of SID

در محیط ONR حاوی غلظت‌های ۱ تا ۵/۵ درصد تلقیح شدند. پس از ۱۵ روز انکوباسیون رشد باکتری‌ها و میزان حذف نفت به شکل کیفی و تعداد باکتری‌ها به شکل CFU/gram محاسبه شد (۱۵).

اثر زمان: سویه‌های *Halomonas sp. isolate BHA16* و *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17* در محیط کشت ONR به همراه نفت به مدت یک ماه انکوبه شدند و سپس، میزان رشد و حذف نفت خام محاسبه شد (۶).

اثر کشت مخلوط: سویه‌های *Halomonas sp. isolate BHA16* و *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17* به مدت ۱۵ روز در محیط کشت ONR به همراه نفت انکوبه شدند و سپس میزان رشد و حذف نفت خام محاسبه شد (۱۶).

نتایج

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام: در پژوهش حاضر ۶ سویه از نمونه‌های شکم‌پا و آب ناحیه اسکله بهمن قشم جداسازی شد که ۴ سویه مربوط به شکم‌پایان است. سویه‌های جداسازی شده در محیط ONR به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. ۲ سویه که قادر به رشد بالاتر در این محیط بودند، به عنوان سویه‌های برتر تجزیه کننده نفت برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. در جدول ۱ ویژگی‌های این باکتری‌ها آمده است.

شناسایی بیوشیمیایی: برای شناسایی اولیه سویه‌ها یک‌سری آزمون‌های بیوشیمیایی روی ۲ سویه غربال شده، انجام شد که در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام جداسازی شده

سویه	نمونه جداسازی شده	شکل باکتری و واکنش گرم	ویژگی‌های کلونی	آزمون کیفی	OD_{600}
HA 1-1	آب	میله‌ای بلند، گرم منفی	سفید، متوسط	+	۰/۴۴
HA 1-2	آب	کوکوباسیل، گرم منفی	سفید، درشت	+	۰/۵۰
HA 2-1	شکم پا	کوکوباسیل، گرم منفی	سفید، متوسط	+	۰/۸۳
HA 2-2	شکم پا	کوکسی، گرم منفی	سفید، ریز	+++	۱/۲۰
HA 2-3	شکم پا	میله‌ای، گرم منفی	سفید، درشت	++	۰/۳۷
HA 2-4	شکم پا	کوکسی، گرم منفی	سفید، موکوئیدی	++++	۲/۳۲

جدول ۲- شناسایی بیوشیمیایی

نام سویه	O/F	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	تولید H_2S	تولید ایندول	احیای نیترات	آزمون TSI
HA 2-2	−/−	+	+	_	_	_	+	قلیا/ قلیا
HA 2-4	−/+	+	+	+	_	_	_	اسید/اسید

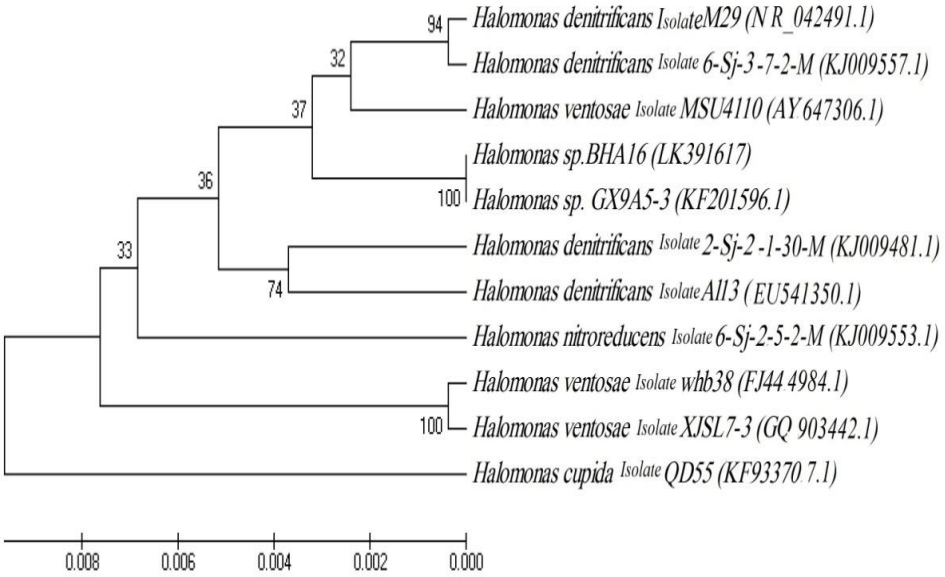
جدول ۳- توالی به دست آمده برای سویه HA 2-2 و HA 2-4

نام سویه	شناسایی سویه	شماره دستیابی
HA 2-2	*Halomonas sp. isolate BHA16*	LK391617
HA 2-4	*Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*	LK391618

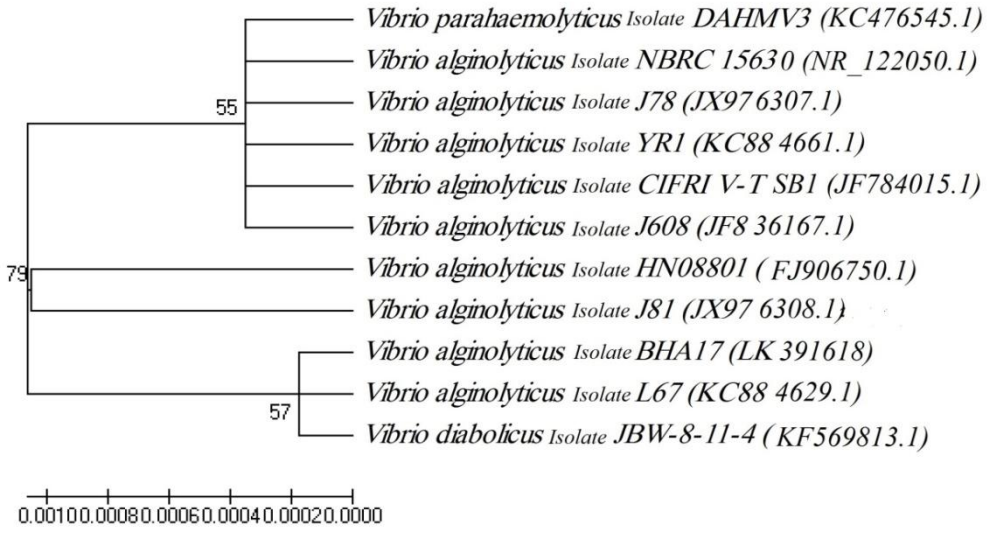
www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی باکتری‌های قوی در تجزیه نفت خام با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی *16S rDNA* با پرایمرهای ویژه این ژن انجام شد. سپس، محصول ۱۴۰۰bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و برای تعیین توالی فرستاده شد. توالی‌های به دست آمده در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸ درصد) به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین شد. توالی به دست آمده و بالاترین همسانی پس از بلاست کردن توالی به‌دست آمده در بانک‌های ژنی به همراه شماره دستیابی توالی این سویه‌ها در پایگاه EMBL در جدول ۳ آمده است. درخت فیلوژنی این دو سویه به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega4 رسم شد. موقعیت فیلوژنی این دوسویه در شکل‌های ۲ و۳ آمده است.



شکل ۲- درخت فیلوژنی جنس *Halomonas* به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega4



شکل ۳- درخت فیلوژنی جنس *Vibrio* به روش Neighbor joining و به کمک نرم افزار Mega4

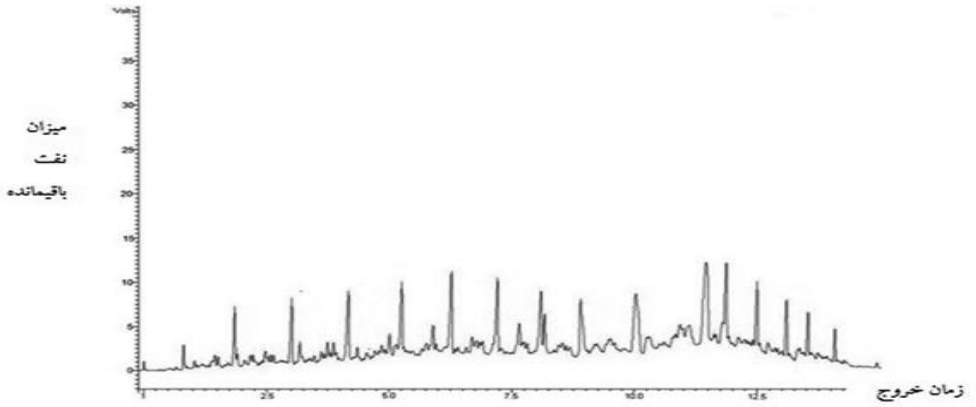
www.SID.ir

Archive of SID

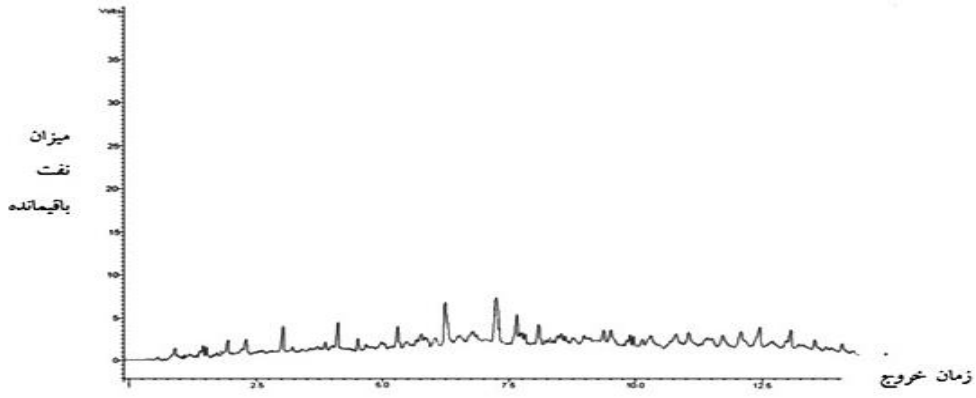
حذف نفت خام توسط سویه‌ها

روش اسپکتروفتومتری: هر دوسویه بر روی غلظت یک درصد نفت خام رشد داده شدند. پس از ۱۵ روز میزان حذف نفت خام به‌وسیله سویه‌ها به روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. به‌طوری که سویه *Halomonas sp. isolate BHA16*، ۵۸/۰۲ درصد و سویه *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*، ۵۰ درصد نفت را تجزیه کردند.

روش کروماتوگرافی: سویه‌ها به مدت ۱۵ روز در محیط کشت ONR حاوی یک درصد نفت خام انکوبه شدند. پس از استخراج نفت باقیمانده با دی کلرومتان، درصد تجزیه نفت توسط هر سویه با استفاده از تحلیل گاز کروماتوگرافی از نفت باقی مانده در محیط کشت برای هر سویه انجام شد. ستون GC به کار رفته با دکتور FID بود. حلال به کار رفته دی‌کلرومتان و دمای نگهداری ستون برای ۱۷ دقیقه است. گاز حامل هلیم و جریان عبوری ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. در شکل‌های زیر نتایج حاصل از گاز کروماتوگرافی به همراه طیف مربوط به هر سویه آمده است. همان‌طور که در شکل‌های ۵ و ۶ دیده می‌شود، طیف‌های کروماتوگرافی سویه‌ها نسبت به شاهد (شکل ۴) کمتر شده که نشان دهنده تجزیه و حذف ترکیبات نفتی است. درصد تجزیه نفت خام توسط هر یک از سویه‌ها با محاسبه سطح زیر منحنی طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل شده از هر سویه با کسر نمودن پیک حلال به‌دست آمد. نتایج نشان داد که سویه‌های *Halomonas sp. isolate BHA16* و *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17* توانستند به ترتیب ۵۱/۴۴ و ۶۷/۵۸ درصد، نفت موجود در محیط کشت را تجزیه کنند.



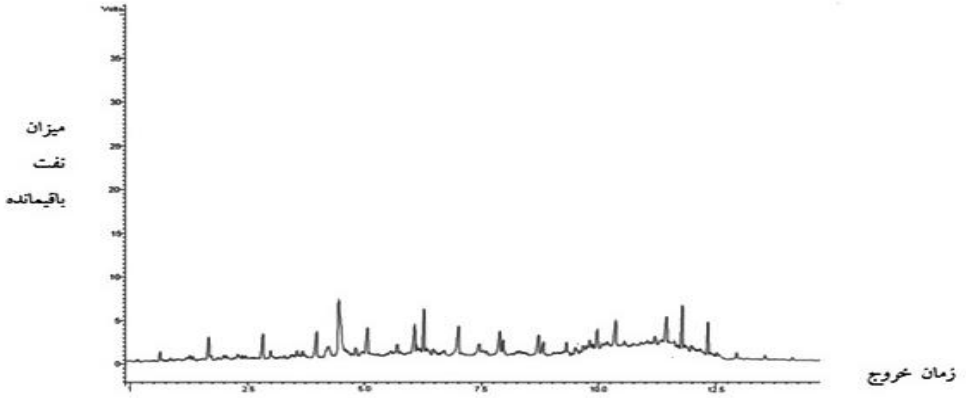
شکل ۴- طیف گاز کروماتوگرافی شاهد (نفت خام بدون تلقیح باکتری)



شکل ۵- طیف گاز کروماتوگرافی سویه *Halomonas sp. isolate BHA16*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- طیف گاز کروماتوگرافی سویه *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*

فعالیت امولسیون کنندگی (E_{24}) و هیدروفوبیسیته سطح سلولی (BATH): فعالیت امولسیون کنندگی (E_{24}) و هیدروفوبیسیته سطح سلولی (BATH) بررسی شد. نتایج به دست آمده از این دو آزمایش برای سویه *Halomonas sp. isolate BHA16*، ۱۱/۶ و ۱۰ درصد و برای سویه *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*، ۵۸/۴ و ۱۶/۵ درصد است.

آزمون هالوفیلیته: رشد کیفی سویه‌های باکتریایی در غلظت‌های ۰ تا ۲۰۰ گرم در لیتر سدیم‌کلرید در محیط کشت ONR در جدول ۴ آورده شده است. بر اساس اطلاعات جدول این دو سویه هالوفیل (به سویه‌هایی گفته می‌شود که در محیط‌های حاوی حداقل ۲ درصد سدیم‌کلرید قادر به رشد باشند) بوده و بهینه رشد آن‌ها در ۲۰ تا ۸۰ گرم در لیتر سدیم‌کلرید است و در غلظت‌های بالاتر نمک، میزان رشد کاهش یافته است.

میزان رشد و حذف نفت توسط سویه‌ها در غلظت‌های مختلف نفت: رشد باکتری‌ها و میزان حذف نفت در غلظت‌های ۱ تا ۵/۵ درصد نفت به شکل کیفی محاسبه شد. جدول ۵ نشان دهنده نتایج حاصل از رشد باکتری در OD_{600}، جدول ۶ نشان دهنده نتایج حاصل از میزان حذف نفت است و در جدول ۷ تعداد باکتری‌ها به شکل CFU/gram آمده است. هر دو سویه در غلظت ۲/۵ در صد نفت خام بهترین رشد را داشته و با افزایش غلظت‌های بیشتر رشدشان کمتر شده به طوری‌که کم‌ترین میزان حذف نفت خام در غلظت ۵/۵ درصد است.

جدول ۴- رشد کیفی سویه‌ها در غلظت‌های صفر تا ۲۰۰ گرم در لیتر سدیم‌کلرید

سویه	۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰	۱۲۰	۱۴۰	۱۶۰	۱۸۰	۲۰۰
BHA16	_	++	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
BHA17	_	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	+

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر رشد باکتری (OD_{600})

غلظت نفت / سویه باکتری	۱ درصد	۲/۵ درصد	۴ درصد	۵/۵ درصد
Halomonas sp. isolate BHA16	۱/۳۰	۱/۸۶	۰/۱۶	۰/۰۸
Vibrio alginolyticus isolate BHA 17	۰/۵۸	۰/۷۳	۰/۲۴	۰/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر میزان حذف نفت خام

غلظت نفت / سویه باکتری	۱ درصد	۲/۵ درصد	۴ درصد	۵/۵ درصد
Halomonas sp. isolate BHA16	۷۶/۰۸	۸۶/۹۵	۳/۴	۰/۰۳
Vibrio alginolyticus isolate BHA 17	۸۱/۲۳	۸۷/۳۲	۲۱/۳۷	۲/۰۳

جدول ۷- اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر تعداد باکتری‌ها

غلظت نفت / سویه باکتری	۱ درصد	۲/۵ درصد	۴ درصد	۵/۵ درصد
Halomonas sp. isolate BHA16	$۳/۸۳\times۱۰^{۷}$	$۲/۱۷\times۱۰^{۷}$	$۳/۲۳\times۱۰^{۷}$	$۵/۵\times۱۰^{۵}$
Vibrio alginolyticus isolate BHA 17	۷×۱۰^{۷}	۹×۱۰^{۷}	۳×۱۰^{۴}	۲×۱۰^{۴}

اثر زمان: میزان رشد، CFU/gram و حذف نفت خام توسط سویه در مدت یک ماه انکوباسیون محاسبه شد. نتایج میزان رشد (OD)، درصد تجزیه و CFU/gram برای سویه *Halomonas sp. isolate BHA16*، به ترتیب ۱/۴۳، ۷۹/۱۱، $۹/۰۴\times۱۰^{۷}$ و برای سویه *Vibrio alginolyticus isolate BHA 17*، ۲/۴۸، ۷۳/۶۴، $۸/۸۷\times۱۰^{۷}$ مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده میزان رشد و حذف نفت خام با افزایش زمان ماند بیشتر شده است.

اثر کشت مخلوط: میزان رشد، CFU/gram و حذف نفت خام در کشت مخلوطی از سویه‌ها محاسبه شد. به‌طوری که میزان رشد (OD)، درصد تجزیه و CFU/gram مخلوط دو سویه به ترتیب ۸۱/۱، ۶۸ و $۲/۷۲\times۱۰^{۶}$ است. بنا بر نتایج به دست آمده میزان رشد و تجزیه در مخلوط سویه‌ها در مقایسه با هر کدام از سویه‌ها به تنهایی بیشتر شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بسیاری روی جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط‌های گوناگون شامل: خشکی و دریایی انجام شده است.

کواریتی[۴] و همکاران تعدادی باکتری گرم مثبت تجزیه کننده آلکان از آب‌های آلوده به هیدروکربن مدیترانه جداسازی کردند و بر این باور بودند که باکتری ها باید مکانیسم معینی برای به دست آوردن و استفاده از این سوبسترای هیدروکربنی داشته باشند (۱۷). همچنین، گزارشاتی از جداسازی سویه‌هایی از باکتری متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Moraxella*، *Marinobacter*، *Flavobacterium*، *Cycloclasticus*، *Sphingomonas* و *Vibrio* از آب‌های دریایی داده شده است (۱۸). حسن شاهیان[۵] و همکاران نیز، ۲۸ سویه باکتریایی و دو سویه مخمری تجزیه کننده نفت از محیط‌های دریایی ایران شامل خلیج فارس و دریای خزر شرح دادند (۷).

www.SID.ir

Archive of SID

در پژوهش حاضر، ۶ سویه تجزیه کننده نفت از نمونه‌های شکم‌پا و آب ناحیه اسکله حقانی بندر عباس جداسازی شد که در نهایت، با سنجش‌های غربال‌گری ۲ سویه باکتریایی انتخاب شد و پس از شناسایی مولکولی مشخص شد که مربوط به جنس *Halomonas* و *Vibrio* است.

در این پژوهش، برخی از شرایطی که روی تجزیه نفت تاثیر گذار هستند، بررسی شد. در پژوهش‌های بسیاری به اثر هر یک از این شرایط پرداخته شده است.

حسن شاهیان و همکاران اثر غلظت‌های ۱ تا ۴ درصد نفت را بر روی میزان تجزیه بررسی کردند. بر اساس مطالعه انجام شده ایشان بهترین میزان تجزیه نفت در غلظت ۱ درصد نفت انجام می‌شود و غلظت بالای هیدروکربن‌ها باعث پراکنده نشدن نفت در آب، مهار تجزیه زیستی با محدودیت اکسیژن یا نیتروژن و ایجاد اثرات سمی ناشی از هیدروکربن‌های فرار می‌شود (۷).

فوزی[۶] و آدوت[۷] گزارش کردند که آلودگی در رسوبات ساحل دریا با غلظت بالاتر از آستانه نفت، به علت محدودیت اکسیژن و مواد غذایی، مانع از تجزیه زیستی نفت می‌شود (۱۹).

در این پژوهش، اثر غلظت‌های ۱، ۲/۵، ۴ و ۵/۵ درصد نفت بر میزان رشد و حذف نفت توسط سویه‌ها بررسی شد. که هر دو سویه بیش‌ترین میزان رشد و تجزیه نفت را در غلظت ۲/۵ درصد داشته و با افزایش غلظت نفت از ۲/۵ درصد به بعد، میزان رشد باکتری و تجزیه نفت کاسته شده است.

یوسال[۸] و تورکمان[۹] مدت زمان انکوباسیون را مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که هر چه زمان ماند افزایش یابد، جمعیت میکروبی سیستم بیشتر خواهد شد که این امر به افزایش سنتز آنزیم و کارایی سیستم منجر می‌شود. همچنین، سبب می‌شود میکروب ها فرصت بیشتری برای تلقیح و عادت کردن به آلایندگی پیدا کرده و بتوانند درصد بیشتری از ترکیبات را تخریب کنند (۲۰). در این پژوهش، هر دو سویه انتخاب شده به مدت یک ماه در انکوباتور قرار گرفتند و مشاهده شد میزان رشد و تجزیه نفت با طولانی شدن دوره انکوباسیون، افزایش یافته است.

افزودن میکروارگانیسم به شکل خالص و مخلوط موضوع بسیاری از مقالات بوده است. ستیشکومار[۱۰] و همکاران روی سویه‌های باکتریایی از جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* پژوهش‌هایی انجام دادند. آن‌ها بر این باور بودند که میزان تجزیه نفت در حضور کشت میکروبی مخلوط بیشتر از کشت منفرد است. به طوری که در کشت مخلوط میزان تجزیه ۷۷ درصد و در کشت خالص سویه باکتریایی از جنس *Pseudomonas* ۴۵ درصد و *Bacillus* ۶۴ درصد گزارش شده بود (۱۶). طبق نتایج حاصل از این پژوهش در کشت میکروبی منفرد، تجزیه هیدروکربن‌ها به شکل ناقص، در حالی که در کشت میکروبی مخلوط تجزیه به شکل کامل انجام می‌گیرد و درصد تجزیه افزایش می یابد. در واقع هنگامی که تجزیه مخلوطی از مواد آلاینده مورد نظر باشد نیز استفاده از مخلوط چند میکروارگانیسم مؤثر است زیرا ممکن است هر یک از اعضای مخلوط در تجزیه یکی یا برخی از مواد آلاینده بیشترین کارایی را داشته باشند.

لدی[۱۱] و کول ول[۱۲] گزارش دادند که جمعیت‌های میکروبی مخلوط با ظرفیت کل آنزیمی گسترده می‌توانند هیدروکربن‌های پیچیده را تجزیه کنند. جمعیت میکروبی مخلوط شامل شماری از میکروارگانیسم‌هاست که آنزیم‌های تجزیه کننده برای

www.SID.ir

Archive of SID

قسمت‌های مختلف مسیرهای تجزیه ترکیبات آروماتیک را سنتز می کنند و با به کار بردن راه‌های متابولیک شانس تجزیه کامل‌تر بیشتر می‌شود (۲۱).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج مطالعات دیگر مطابقت دارد. به طوری که کشت مخلوط سویه ها میزان بالاتری از تجزیه را نسبت به کشت آن‌ها به تنهایی دارد.

پروتی[۱۳] و کامترا[۱۴] سویه‌های باکتریایی تولید کننده بیوسورفکتانت را از طریق سنجش هیدروفوبیسیته سطح سلولی غربال‌گری کردند. آن‌ها یک رابطه مستقیم بین هیدروفوبیسیته سطح سلولی و تولید بیوسورفکتانت مشاهده کردند، به طوری‌که هر چه یک باکتری سطح هیدروفوبی بیشتری داشته باشد، قابلیت تولید بیوسورفکتانت بیشتری دارد. بیوسورفکتانت تولید شده کشش سطحی بین فاز آلی و فاز آبی را کم کرده در نتیجه موجب ایجاد امولسیون هیدروکربنی در آب می‌شود. این امر دستیابی باکتری‌ها به هیدروکربن‌های نفتی را افزایش داده و موجب بالاتر رفتن تجزیه زیستی می‌شود (۲۲ و ۲۳).

در پژوهش حاضر، باکتری‌های تجزیه کننده نفت همزیست با شکم‌پا و محیط پیرامون آن جداسازی شد. ضمن شناسایی این باکتری‌ها، تراکم وتنوع باکتری‌ها در نمونه‌های شکم‌پا و محیط اطراف و قابلیت تجزیه نفت توسط آن‌ها بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری‌های موجود در خلیج فارس از تنوع زیاد با توان تجزیه نفت بالا برخوردار هستند و می‌توان از آن‌ها برای پاک‌سازی مناطق دریایی آلوده به نفت استفاده کرد. البته باید در نظر داشت که غلظت نفت موجود در مناطق آلوده نفتی بر میزان تجزیه‌کنندگی نفت به‌وسیله این باکتری‌ها تاثیر مستقیم دارد. در مناطق آلوده، کاهش غلظت نفت با روش‌های فیزیکی می‌تواند زمینه را برای تجزیه زیستی نفت فراهم سازد. بر این اساس می‌توان از این گونه‌ها برای حذف آلودگی‌های نفتی استفاده کرد.

References

(1) Alemagi D. The oil industry along the Atlantic coast of Cameroon: assessing impacts and possible solutions. *Resources Policy* 2007; 32 (3): 135- 45.

(2) Hassanshahian M., Zeynalipour MS., Hosseinzadeh Musa F. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Marine Pollution Bulletin* 2014; 82: 39- 44.

(3) Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology Review* 1981; 45: 180- 209.

(4) Cavallo RA., Acquaviva MI., Stabili L. Culturable heterotrophic bacteria in sea water and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea-Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 2009; 149: 465- 75.

(5) Bayat Z., Hassanshahian M., Askeri Hesni M. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 2015; 101 (1): 85- 91.

(6) Hasanshahian M., Emtiazi G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodegrad* 2008; 62: 170- 8.

(7) Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil- degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2012; 64: 7- 12.

(8) Holt SG., Kriey NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST. *Bergy's Manual of Determinative for Bacteriology*. 4th ed. New York: Williams and Wilkins; 1996.

www.SID.ir

Archive of SID

(9) Yakimov MM., Timmis KN., Golyshin PN. Obligate oil- degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18 (3): 257- 66.

(10) Rahman KSM., Thahira- Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour Technology* 2004; 85: 257- 61.

(11) Bayat Z., Hassanshahian M., Askeri Hesni M. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Mactra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 105 (1): 120- 4.

(12) Pruthi V., Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant- producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techonology* 1997; 11: 671- 4.

(13) Batista SB., Mounteer A., Amorim FR., Totola MR. Isolation and characterization of biosurfactant bioemulsifier- producing bacteria frompetroleum contaminated sites. *Bioresour Technology* 2006; 97: 868- 75.

(14) Ebrahimipour Gh., Aminian M., Abolhasani Soorki A. Isolation of a Petroleum- degrading Halo Tolerant Bacterium and Study the Effects of Environmental Factors in Biodegrading for Environmental Protection. *Environmental Sciences* 2005; 8: 65- 74.

(15) Khan Kh., Naeem M., Asif M. Extraction and Characterization of Oil Degrading Bacteria. *Journal of Applied Sciences* 2006; 6 (10): 2302- 6.

(16) Sathishkumar M., Binupriya A., Baik SH., Yun RE. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. *Clean* 2008; 36 (1): 92- 6.

(17) Quatrini P., Scaglione G., De Pasquale C., Riela S., Puglia AM. Isolation of Gram-positive n- alkane degraders from a hydrocarbon- contaminated Mediterranean shoreline. *Applied Environmental Microbiology* 2008; 104 (1): 251- 9.

(18) Kasai Y., Kishira H., Harayama Sh. Released in a Marine Environment Degradation of Aromatic Hydrocarbons *Cycloclasticus* Play a Primary Role in the Bacteria Belonging to the Genus. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68 (11): 5625- 33.

(19) Fusey P., Oudot J. Relative influence of physical removal and biodegradation in the depuration of petroleum- contaminated seashore sediments. *Marine Pollution Bulletin* 1984; 15: 136- 41.

(20) Uysal A., Turkman A. Biodegradation of 4- Cp In an Activated Sludge Reactor: Effect Of Biosurfactant And The Sludge Age. *Journal of Hazardous Material* 2007; 21: 71- 6.

(21) Leahy JG., Colwell RR. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Applied Environmental Microbiology* 1990; 54: 305- 15.

(22) Pruthi V., Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant- producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techonology* 1997; 11: 671- 4.

(23) Hassanshahian M., Emtiazi G. Isolation, and molecular detection of Alcanivorax dieselolei in the Persian Gulf and the study of biodegradation ability for remediation of oil pollution. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (1): 1- 4.

[1]- Gas Chromatography
[2]- Bacterial Adhesion To Hydrocarbon
[3]- Emulsification Activity
[4]- Quatrini
[5]- Hassanshahian
[6]- Fusey
[7]- Oudot
[8]- Uysal
[9]- Turkman
[10]- Sathishkumar
[11]- Leady
[12]- Colwell
[13]- Pruthi
[14]- Cameotra

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and identification of crude oil degrading bacteria from gastropod *Haustrum scobina* collected from Persian Gulf (Bandar Abbas Shoreline provenance)

Zeinab Bayat
M.Sc. of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, zeynabbayat167@gmail.com
Mehdi Hassanshahian *
Associate Professor of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, hasanshahi@gmail.com
Majid Askari Hesni
Assistant Professor of Marine Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, majidask@gmail.com

Abstract

Introduction: Biodegradation is a good alternative rather than chemical and physical methods for cleaning oil contaminated areas. Several factors like crude oil concentration, biosurfactant production, salinity and incubation time affect the biodegradation.

Materials and methods: In this study, seawater sample and gastropod were collected from Persian Gulf. To isolate oil degrading bacteria from collected samples, ONR7a medium was used. The strains that had more growth and higher oil removal were selected and identified. The factors such as the effect of different concentrations of oil, incubation time, mixed cultures and salinity on the biodegradation were investigated.

Results: Six crude oil degrading bacteria were isolated. Between these bacteria 2 strains were selected based on higher oil removal. These strains belonged to the genus *Vibrio* and *Halomonas*. Strains with higher Emulsification activity produce more biosurfactant and have higher oil biodegradation. Growth and oil degradation have increment pattern by prolonging the incubation time. Mixed culture of *Vibrio* and *Halomonas* strains have higher rates of degradation rather than culturing with one of them. Increase in crudeoil concentration to 2.5% caused reduction in growth of bacteria and degradation of oil.

Discussion and conclusion: The results of this study show that crude oil degrading bacteria have high diversity in Persian Gulf. These bacteria have higher capability for oil degradation thus they can be used for remediation of oil contaminated areas.

Key words: Biodegradation, Gastropod, Oil degrading bacteria

* Corresponding author
Received: December 1, 2014 / **Accepted:** April 22, 2015

www.SID.ir