Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۰۴- ۹۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۰۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده گازوئیل از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان خوزستان

مهدی حسن شاهیان[*]: دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، mshahi@uk.ac.ir

چکیده

مقدمه: گازوئیل که یکی از محصولات عمدهٔ نفت خام است، منبع عمدهٔ آلودگی محیط زیست به شمار می‌رود و می‌تواند آثار خطرناک زیستی بر محیط اطراف بگذارد. یکی از روش‌های بازیابی این مناطق آلوده و واردکردن آن‌ها به چرخهٔ تولید محصول سالم، حذف آلاینده‌ها با روش‌های زیستی است که از این میان روش تجزیهٔ زیستی با توجه به استفاده از توان طبیعی و پتانسیل‌های نهفتهٔ طبیعت و هزینهٔ کمتر بیشتر موردِتوجه بوده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جهت جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل ابتدا نمونه‌برداری از مناطق آلوده در استان خوزستان به عمل آمد. باکتری‌های جداسازی‌شده با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. صفاتی در این باکتری‌ها همچون آب‌گریزی سطح سلولی و فعالیت امولسیونه‌کنندگی بررسی شد. میزان حذف گازوئیل با روش کروماتوگرافی گازی و به‌صورت کیفی برای هر سویه مشخص شد.

نتایج: در این پژوهش از بین ۳۴ سویهٔ تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل جداسازی شده، ۱۰ سویه براساس حذف گازوئیل بیشتر انتخاب شدند. نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نشان داد که این سویه‌ها به جنس‌های *Achromobacter*، *Enterobacter* و *Klebsiella* تعلق داشتند. این باکتری‌ها در طی ۱۰ روز بیش از نیمی از گازوئیل را حذف می‌کردند. بیشترین حذف گازوئیل مربوط به سویهٔ *Enterobacter cloacae strain L2* (۷۲درصد) بود. بیشترین آب‌گریزی سطح سلولی مربوط به باکتری مربوط به سویهٔ *Klebsiella oxytoca strain K2* (۷۶درصد) و بیشترین فعالیت امولسیون‌کنندگی مربوط به سویهٔ *Achromobacter denitrificans strain B2* (۵۸درصد) بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش ثابت کرد که باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل در خاک‌های آلوده در ایران از تنوع مناسبی برخوردار هستند و پتانسیل استفاده در حذف آلودگی گازوئیلی از خاک را دارند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، باکتری، تجزیه زیستی، خوزستان ،گازوئیل.

* نویسندهٔ مسئول 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

امروزه آلودگی نفتی به‌عنوان یکی از خطرناک‌ترین آلودگی‌های محیطی شناخته شده است. گازوئیل که یکی از محصولات عمدهٔ نفت خام است، منبع عمده آلودگی محیط زیست به شمار می‌رود که می‌تواند آثار خطرناک زیستی بر محیط اطراف اعمال کند. گازوئیل می‌تواند در نتیجهٔ فعالیت‌های انسانی در انتقال از منابع به محل‌های مصرف، پالایش، ذخیره‌سازی و همچنین استفادهٔ نادرست آن توسط مصرف‌کننده‌ها و فعالیت‌های کشتیرانی وارد محیط شود. از تقطیر نفت مازوت مایعی حاصل می‌شود که عمدتاً جهت روشن‌کردن موتورهای دیزلی به کار می‌رود؛ به این سوخت گازوئیل گویند. محدودهٔ هیدروکربن‌های گازوئیل بین C_{11}-C_{25} و دامنهٔ تقطیر آن ۱۸۰ تا ۳۸۰ درجه سانتی‌گراد است. گازوئیل از ۳ گروه ساختاری اصلی هیدروکربنی تشکیل شده است که شامل آلکان‌ها، سیکلوآلکان‌ها و ترکیبات اروماتیک است. نسبت این ترکیبات در گازوئیل‌های مختلف، متفاوت است (۱ و ۲).

بیشتر ترکیبات موجود در گازوئیل برای سیستم‌های زیستی مضر هستند. نشت گازوئیل بر روی زمین‌های کشاورزی، رشد گیاهان را کاهش می‌دهد که به‌دلیل اثر سمیت مستقیم بر گیاهان و کاهش جوانه‌زنی که در نتیجهٔ عدم تهویهٔ مناسب خاک است صورت می‌گیرد (۳). پیامد آن حذف پوشش گیاهی، ازبین‌رفتن پدیدهٔ فتوسنتز، فرسایش خاک، خالی‌شدن ساختار اجتماعات گیاهی، افزایش نفوذپذیری خاک نسبت به آلاینده‌ها و در آخر، آلودگی منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی است. آلاینده‌های موجود در خاک می‌توانند وارد زنجیرهٔ غذایی شوند و سلامت حیوان و انسان را با خطر جدی مواجه سازند. گازوئیل نسبتاً در آب محلول است و می‌تواند در بافت‌ها تجمع پیدا کند (۳).

تعداد زیادی از باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها می‌توانند سوبستراهای هیدروکربنی گازوئیل را تجزیه کنند. ترکیبات هیدروکربنی باید قبل از تجزیه‌شدن وارد سلول شوند. با این حال، تماس مستقیم بین هیدروکربن‌ها که ماهیت آب‌گریز دارند و غشای سلول که بخش‌های آب‌گریز دارد بدلیل نیروی دافعه دو ترکیب آب گریز ممانعت می شود. تجزیهٔ هیدروکربن‌ها توسط میکروب‌ها تا حد زیادی توسط فراهمی‌زیستی هیدروکربن‌ها، تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد. خصوصیات شیمیایی هیدروکربن‌ها، فراهمی‌زیستی آن‌ها را تعیین می‌کند. برای تجزیه، هیدروکربن‌ها ابتدا باید توسط میکروب‌های تجزیه‌کننده جذب شوند که به معنای فرایند انتقال غشاگذر است. جذب دارای دو مرحله است: ارائهٔ هیدروکربن‌ها به میکروب‌ها و انتقال غشاگذر. ترکیبات آلی به‌طور طبیعی برای جذب سوبسترا به‌شکل محلول هستند؛ درحالی‌که جذب بر روی ذرات خاک یک مانع برای تجزیه ایجاد می‌کند (۴). مکانیسم‌های متفاوتی توسط گونه‌های تجزیه‌کننده برای افزایش جذب هیدروکربن‌ها وجود دارد؛ برای مثال ترشح بیوسورفاکتانت‌ها یا امولسیون‌کننده‌ها. بیوسورفاکتانت‌ها مولکول‌های فعال سطحی هستند که می‌توانند به‌عنوان پراکنده‌سازها و عوامل اصلاح‌کنندهٔ سازگار با محیط زیست در فرایندهای بازسازی مثل تصفیهٔ زیستی، شستشوی خاک و غیره به کار روند (۵).

تاکنون تعداد زیادی از باکتری‌هایی که قادرند گازوئیل را تجزیه کنند، از خاک های آلوده جداسازی شده‌اند. به‌طور مثال دو جنس باکتریایی *Micrococcus* و *Pseudomonas* از گاراژ ماهاراشترا[1] در هند

Archive of SID

جداسازی شده است. در این بررسی سرعت تجزیهٔ زیستی هریک از جنس‌ها به دست آمد و نشان داده شد که سرعت تجزیهٔ زیستی حالت مخلوط این دو جنس باکتری از حالت منفرد آن‌ها بیشتر است (۶). در یک پژوهش با استفاده از یک جمعیت میکروبی مخلوط که از انستیتو مکزیک به دست آمده بود نشان داده شد که با افزودن تلقیح میکروبی به خاک و افزودن تدریجی مواد غذایی، فعالیت میکروبی در خاک آلوده به هیدروکربن‌ها را می‌توان افزایش داد (۷).

با توجه به آلودگی‌های نفتی گسترده در استان خوزستان و آثار زیان‌بار این آلودگی‌ها بر روی خاک و پوشش گیاهی این منطقه، این پژوهش در جهت پیداکردن باکتری‌هایی که می‌توانند این نوع آلودگی را حذف کنند طراحی شده است. درخصوص باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام تاکنون کارهای بسیاری انجام شده است. اما گزارشات بسیار کمی دربارهٔ جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل وجود دارد. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری‌های مؤثر در تجزیهٔ گازوئیل از خاک‌هایی است که در زمان‌های متمادی تحت‌تأثیر آلودگی نفتی بوده‌اند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های خاک از پنج ایستگاه نشت گازوئیل از مناطق نفتی مسجد سلیمان، میدان نفت و گاز مارون، میدان نفتی آزادگان، پالایشگاه نفت آبادان، صنایع پتروشیمی اهواز در استان خوزستان جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری تحت شرایط استریل انجام شد. ابتدا ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک برداشته شد و حدوداً ۴۰۰ گرم از خاک داخل ظروف استریل ریخته شد. نمونه‌های خاک تا انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شدند و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا انجام آزمایشات بعدی قرار داده شدند.

جدا سازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل: جهت جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل از محیط بوشنل هاس حاوی ۱درصد گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. از نمونه‌های خاک به‌میزان ۵ گرم داخل این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و بر روی شیکر با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ هفته قرار گرفت. پس از گذشت یک هفته میزان ۵ میلی‌لیتر از این محیط برداشته شد و به محیط BH جدید حاوی ۱درصد گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن انتقال یافت. عمل شیک‌کردن برای پاساژ دوم به‌مدت یک هفته ادامه یافت تا کدورت به‌دست‌آمدهٔ ناشی از رشد باکتری‌های تجزیه‌کننده باشد و آلودگی ترکیبات دیگر در نمونه کاهش یابد. از پاساژ پایانی (پاساژ سوم)، میزان ۱۰۰میکرولیتر بر روی محیط NAپخش شد و پس از رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ، باکتری‌های متفاوت از نظر کلنی جداسازی شدند و هر کلنی منحصربه‌فرد، به محیط NA جدید منتقل شدند (۸). برای شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از منابع فوق از آزمایش‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل کلنی، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، اکسایش/ تخمیر (O/F)، احیای نیترات، تولید H_2S، تولید اندول و آزمون TSI استفاده شد (۹).

شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل: شناسایی مولکولی با تکثیر قسمتی از ژن *16S rDNA* توسط پرایمرهای رفتی 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و پرایمر برگشتی 5-TACGYTACCTTGTTACGACTT -3

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد. برنامهٔ PCR برای تکثیر ژن بدین صورت بود: دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ است محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱درصد بارگذاری شد و سپس باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و جهت تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست‌شده و همولوژی آن‌ها بررسی شد و قرابت بالاتر از ۹۸درصد به‌عنوان جنس و گونهٔ باکتری مجهول لحاظ شد (۱۰).

سنجش حذف گازوئیل توسط باکتری‌های جداشده:

روش اسپکتروفتومتری: برای این منظور یک کشت ۲۴ساعته از باکتری در محیط NA تهیه شد و با استفاده از محیط BH، کدورت همهٔ آن‌ها با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر در یک مقدار مشخص تنظیم شد (OD_{600}=2). سپس باکتری‌ها در دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها به محیط بوشنل هاس براث حاوی ۱درصد گازوئیل تلقیح شدند و بر روی شیکر با دور ۱۶۰rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد همراه با شاهد قرار داده شدند. در انتهای دورهٔ انکوباسیون (۱۰ روز) میزان ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان (DCM) به ارلن حاوی کشت باکتری و گازوئیل اضافه شد. DCM به‌خوبی با محیط گازوئیل بوشنل براث مخلوط شد و درون قیف جداکننده ریخته شد تا فاز آلی و آبی از هم جدا شوند. سپس فاز آلی که حاوی گازوئیل حل‌شده در DCM[۳] بود درون ارلن ریخته شد و ۳ گرم سدیم سولفات جهت جذب آب باقیمانده به ارلن اضافه شد و به‌مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد و در دمای محیط جهت تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM مجدداً ۱۰۰میکرولیتر DCM به ۱۰۰ میکرولیتر گازوئیل باقیمانده اضافه شد و توسط دستگاه GC آنالیز شد. برنامهٔ GC بدین صورت بود: ستون varian (30 m × 0.32 mm × 0.1 µm) capillary column cp-sil5cB دتکتور FID، گاز حامل هلیم، دمای اولیه ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای انتقال ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد ، دمای تزریق ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد ، دمای نگهداری ستون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای نهایی ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و جریان عبوری ۲۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پیک‌های حاصل از GC با شاهد مقایسه شد و درصد تجزیه برای هر سویه محاسبه شد (۱۱).

روش گاز کروماتوگرافی[۲] (GC): در این روش یک کشت ۲۴ساعته از باکتری در محیط NA تهیه شد و با استفاده از محیط BH، کدورت همهٔ آن‌ها با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر در یک مقدار مشخص تنظیم شد (OD_{600}=2). سپس باکتری‌ها در دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها به محیط بوشنل هاس براث حاوی ۱درصد گازوئیل تلقیح شدند و بر روی شیکر با دور ۱۶۰rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد همراه با شاهد قرار داده شدند. در انتهای دورهٔ انکوباسیون (۱۰ روز) میزان ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان (DCM) به ارلن حاوی کشت باکتری و گازوئیل اضافه شد. DCM به‌خوبی با محیط گازوئیل بوشنل براث مخلوط شد و درون قیف جداکننده ریخته شد تا فاز آلی و آبی از هم جدا شوند. سپس فاز آلی که حاوی گازوئیل حل‌شده در DCM[۳] بود درون ارلن ریخته شد و ۳ گرم سدیم سولفات جهت جذب آب باقیمانده به ارلن اضافه شد و به‌مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد و در دمای محیط جهت تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM مجدداً ۱۰۰میکرولیتر DCM به ۱۰۰ میکرولیتر گازوئیل باقیمانده اضافه شد و توسط دستگاه GC آنالیز شد. برنامهٔ GC بدین صورت بود: ستون varian (30 m × 0.32 mm × 0.1 µm) capillary column cp-sil5cB دتکتور FID، گاز حامل هلیم، دمای اولیه ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای انتقال ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد ، دمای تزریق ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد ، دمای نگهداری ستون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای نهایی ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و جریان عبوری ۲۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پیک‌های حاصل از GC با شاهد مقایسه شد و درصد تجزیه برای هر سویه محاسبه شد (۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش هیدروفوبیسیته سطح سلولی[۴] (BATH): ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در بافر تهیه شد . ترکیبات بافر به شرح زیر است (گرم بر لیتر) ۲۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲۲ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۷/۲۶ گرم اوره و ۰/۲ گرم منیزیم سولفات. سپس ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکربن هگزا دکان به آن اضافه شد و پس از ۲ دقیقه همزنی، ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا فاز هیدروکربنی جدا شود و کدورت فاز آبی قبل و بعد از تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت جذب فاز آبی بعد از تیمار نسبت به جذب اولیهٔ سوسپانسیون باکتریایی محاسبه شد (۱۲).

فعالیت امولسیونه‌کنندگی[۵] (E24): باکتری‌های تجزیه‌کننده ابتدا در محیط نوترینت براث به‌همراه ۴درصد نمک کشت داده شدند و پس از آنکه باکتری‌ها به رشد لگاریتمی رسیدند، میزان ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت درون لولهٔ آزمایش حاوی ۶ میلی‌لیتر از نفت سفید استریل ریخته شد و با سرعت بالا همزنی شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت به‌صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت فعالیت امولسیونه‌کنندگی با فرمول زیر به دست آمد (۱۳).

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع ناحیه امولسیون شده}}{\text{کل ارتفاع مایع}} \times ۱۰۰$$

منحنی رشد سویه در محیط حاوی گازوئیل: برای این منظور یک کشت ۲۴ساعته از هر باکتری در محیط NB تهیه شد و با استفاده از بافر فسفات، کدورت آن با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر در یک مقدار مشخص تنظیم شد (OD_{600}=1). سپس باکتری به محیط بوشنل هاس براث حاوی غلظت یک درصد گازوئیل تلقیح شد. ارلن‌ها بر روی شیکر با دور ۱۶۰ rpm در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و رشد باکتری‌ها با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر روزانه سنجش شد (۱۳).

نتایج

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل: در طی این پژوهش ۳۴ سویه باکتری از نمونه‌های خاک جداسازی شد. کلیهٔ ۳۴ سویهٔ جداسازی‌شده در محیط حاوی گازوئیل به‌عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. تنها ۱۰ سویه قادر به رشد بالاتر و تجزیهٔ بیشتری از گازوئیل بودند که به‌عنوان سویه‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل انتخاب و مطالعات بعدی روی آن‌ها انجام گرفت. در جدول ۱ پاره‌ای از ویژگی‌های این باکتری‌ها آمده است.

جدول ۱- باکتری‌های جداسازی‌شده و ویژگی‌های آن‌ها

نام سویه	شکل باکتری و واکنش گرم	ویژگی‌های کلنی	نتیجهٔ آزمون کیفی	OD_{600}
A1	باسیل گرم‌منفی	درشت سفید	+++	۰/۸۵۳
A2	باسیل بلند تیپیک گرم‌منفی	نقطه قطره ریز سفید	+++	۱/۹۲۵
A3	باسیل متوسط گرم‌منفی	ریز حاشیه‌ای سفید	+++	۱/۸۷۰
B1	باسیل ریز گرم‌منفی	متوسط نخودی	-	۰/۲۳۸
B2	کوکو باسیل گرم‌منفی	ریز سرسوزنی شیری	++	۱/۶۷۰
B3	کوکو باسیل گرم‌منفی	درشت شیری	-	۰/۷۶۲
C1	باسیل ریز گرم‌منفی	ریز سفید	++++	۲/۱۰۶
D3	کوکو باسیل گرم‌منفی کورینه فرمی	درشت سفید	+++	۱/۷۹۸
K2	کوکو باسیل گرم‌منفی	متوسط مات لزج	++++	۲/۳۰۹
L2	باسیل بلند گرم‌منفی	درشت مات	++++	۱/۷۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

انتخاب سویه‌های برتر تجزیه‌کننده گازوئیل با غربالگری باکتری‌های جداسازی‌شده: در این مرحله فعالیت امولسیون‌کنندگی (E_{24}) و هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی (BATH) ۱۰ سویهٔ تجزیه‌کننده بررسی شد. سویه‌های برتر با درنظرگرفتن این دو ویژگی انتخاب شدند. نتایج حاصل در جدول ۲ آمده است با توجه به این جدول بیشترین هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی مربوط به سویهٔ *K2* و بیشترین فعالیت امولسیون‌کنندگی مربوط به سویه‌های *A3* و *B2* است.

شناسایی بیوشیمیایی: پس از غربالگری اولیه، آزمون‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی سویه‌های برتر انجام شد. در جدول ۳ نتایج حاصل از این آزمون‌ها برای هر سویه آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که سویه‌ها در برخی صفات بیوشیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند. با توجه به جدول سویه‌های *A2, A3, B3, K2* غیر متحرک و سویه‌های *A1, K2, L2* قابلیت تولید گاز در محیط TSI را دارند.

جدول ۲- فعالیت امولسیون‌کنندگی و هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی سویه‌ها

نام سویه	فعالیت امولسیون‌کنندگی (E_{24} %)	هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی (BATH %)
A1	۱۵	۲
A2	۴۶	۷
A3	۵۰	۸
B1	۳۳	۲
B2	۵۸	۹
B3	۱۶	۳
C1	۴۱	۶۱
D3	۳۳	۴
K2	۴۶	۷۶
L2	۳۰	۱۸

جدول ۳- نتیجه آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه‌کننده

نام سویه	TSI	تولید گاز	تولید اندول	حرکت	O/F	کاتالاز	اکسیداز
A1	قلیا/ اسید	+	−	+	+/-	+	−
A2	قلیا/ قلیا	−	−	−	−/−	+	−
A3	قلیا/ قلیا	−	−	−	−/−	+	+
B1	قلیا/ قلیا	−	−	+	−/−	+	+
B2	قلیا/ قلیا	−	−	+	−/−	+	+
B3	قلیا/ قلیا	−	−	−	−/−	+	−
C1	قلیا/ قلیا	−	−	+	+/-	+	+
D3	قلیا/ قلیا	−	−	+	+/+	+	+
K2	اسید/ اسید	+	+	−	+/+	+	−
L2	اسید/ اسید	+	−	+	+/+	+	−

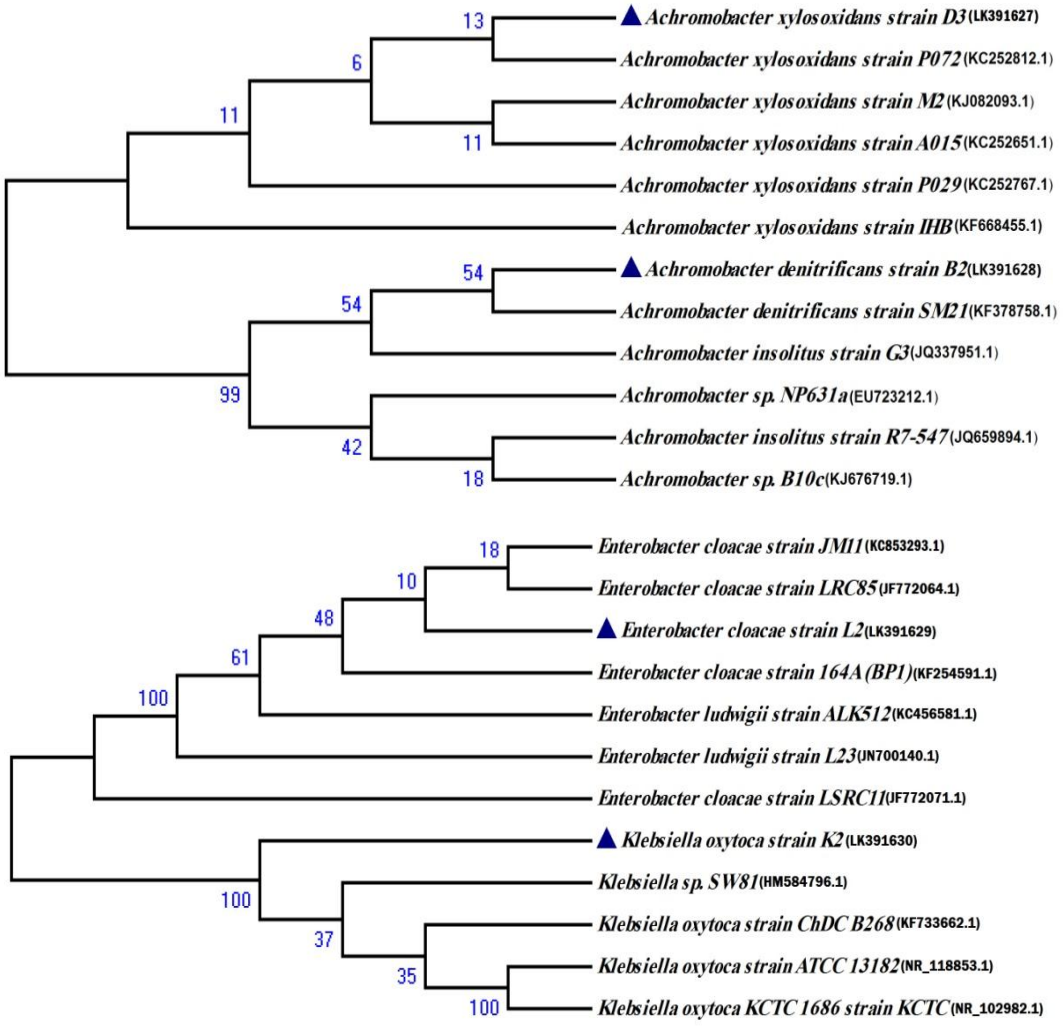
www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی باکتری‌های قوی در تجزیهٔ گازوئیل با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی *S 16rRNA* با پرایمرهای ویژهٔ این ژن انجام شد. سپس محصول ۱۴۰۰bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و جهت تعیین توالی فرستاده شد. توالی‌های حاصل‌شده در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸درصد) به‌عنوان جنس و گونهٔ باکتری تعیین شد. توالی حاصل‌شده و بالاترین همسانی پس از بلاست کردن توالی به‌دست‌آمده در بانک‌های ژنی به‌همراه شمارهٔ دستیابی توالی این سویه‌ها در پایگاه EMBL برای هر سویه در جدول ۴ آمده است. فیلوژنی این باکتری‌ها در شکل ۱ آمده است.

جدول ۴- توالی به‌دست‌آمده برای سویه‌های تجزیه‌کنندهٔ برتر

نام سویه	شناسایی سویه	شمارهٔ دستیابی
B2	*Achromobacter denitrificans*	LK391628
D3	*Achromobacter xylosoxidans*	LK391627
K2	*Klebsiella oxytoca*	LK39163
L2	*Enterobacter cloacae*	LK391629



شکل ۱- درخت فیلوژنی جنس‌های *Achromobacter*، *Enterobacter* و *Klebsiella*

www.SID.ir

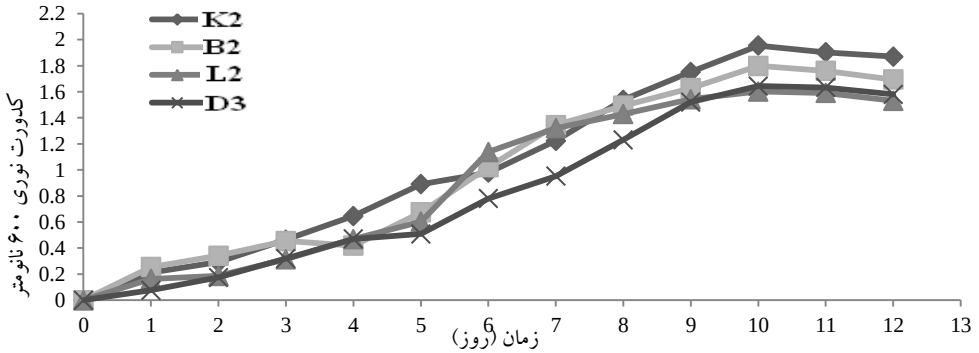
Archive of SID

رشد و تجزیهٔ گازوئیل توسط سویه‌های برتر: کلیهٔ سویه‌ها در محیط BH حاوی ۱درصد گازوئیل در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۶۰ به‌مدت ۱۰ روز کشت داده شدند. سپس میزان رشد سویه‌ها به‌صورت کیفی و کمی با مقایسه با نمونه شاهد به دست آمد. درصد تجزیهٔ گازوئیل نیز با محاسبه سطح زیر منحنی برای هر نمونه به دست آمد. نتایج حاصل‌شده در جدول ۵ آمده است. پیک‌های حاصله از گاز کروماتوگرافی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود هر چهار سویهٔ برتر قادر به حذف بیش از ۵۰درصد نفت پس از ده روز هستند اما سویهٔ *L2* بالاترین میزان حذف گازوئیل را دارد.

منحنی رشد سویه‌های برتر تجزیه‌کننده: برای این منظور، رشد باکتری‌های درون ارلن‌های حاوی محیط بوشنل براث که بر روی شیکر با دور ۱۶۰rpm در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده بودند، با خواندن جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر با فاصله زمانی ۱ روزه سنجش شد. نتایج حاصل‌شده در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، بیشترین میزان رشد پس از ۱۰ روز مربوط به سویهٔ *K2* با OD_{600}=۱/۹۵ بود که قدرت تجزیه‌کنندگی بالایی در مقایسه با سایر سویه‌ها دارد و کمترین میزان رشد مربوط به سویهٔ *L2* با OD_{600}=۱/۲۳ بود که قدرت تجزیه‌کنندگی پایینی نیز دارد.

جدول ۵- میزان رشد ودرصد حذف گازوئیل سویه‌ها پس از ۱۰ روز

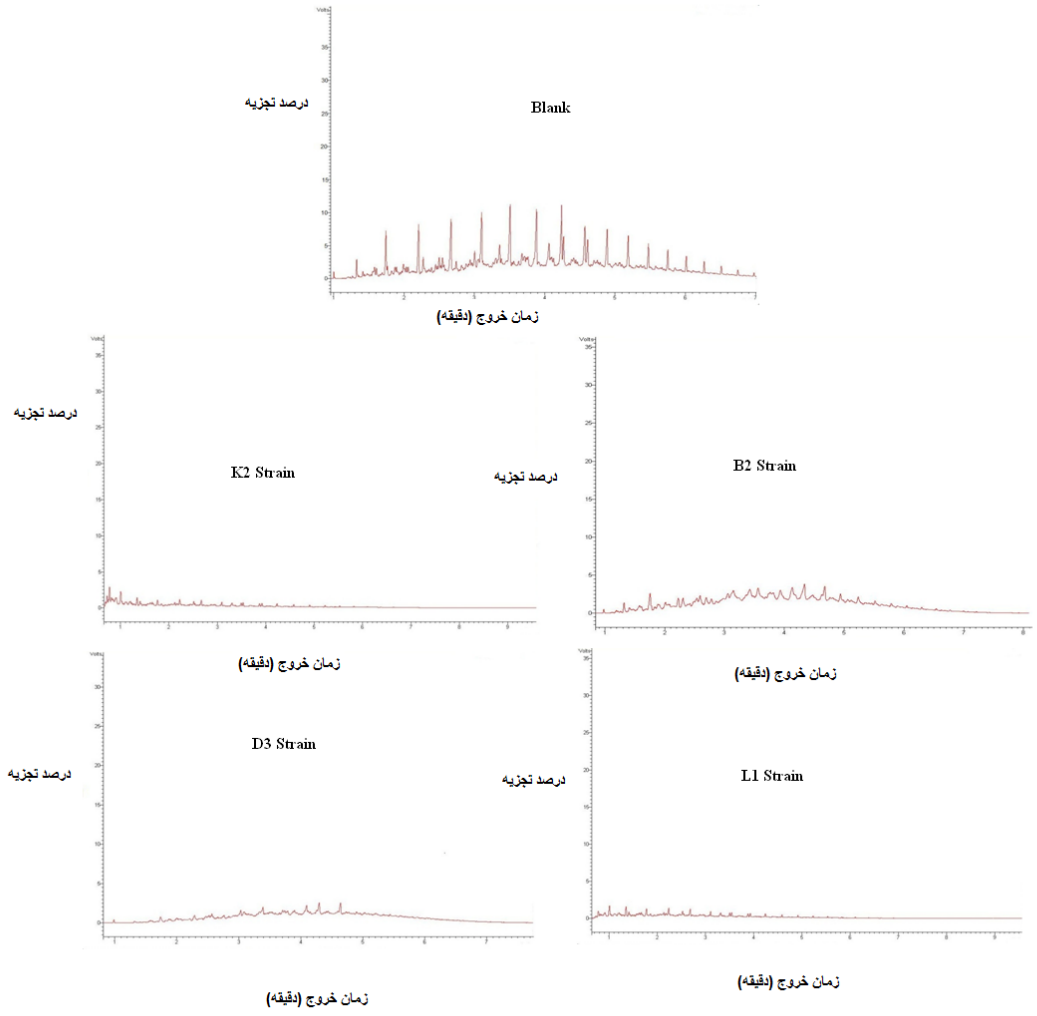
نام سویه	OD_{600}	رشد کیفی (محیط عمومی)	رشد کیفی (محیط اختصاصی)	درصد تجزیهٔ محاسبه‌شده با GC
Achromobacter denitrificans strain B2	۱/۶۷۰	++	++	55
Achromobacter xylosoxidans strain D3	۱/۷۹۸	++	++	61
Klebsiella oxytoca strain K2	۱/۳۰۹	+	+	۵۳
Enterobacter cloacae strain L2	۱/۷۱۵	+	++	72



شکل ۳- منحنی رشد چهار سویهٔ برتر در محیط حاوی گازوئیل

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل‌شده از تجزیهٔ گازوئیل توسط باکتری‌های برتر

بحث و نتیجه‌گیری

توانایی میکروبی برای تجزیهٔ هیدروکربن‌های گازوئیل در خاک و آب مشاهده شده است. پژوهشگران متعددی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیل را از محیط‌های گوناگون جداسازی کرده‌اند. از جمله اکوسیستم‌های دریایی می‌توان به پژوهش لو[۶] و همکاران اشاره کرد. آن‌ها در پژوهش خود از آب‌های آلودهٔ چین یک سویهٔ باکتریایی متعلق به جنس *Acinetobacter* جداسازی کردند (۱۱).

شوکور[۷] و همکاران از خاک‌های آلوده به گازوئیل در اندونزی یک باکتری متعلق به جنس *Staphylococcus aureus* جدا کردند (۱۴). همچنین این پژوهشگران موفق به جداسازی یک جنس *Pseudomonas* از منطقهٔ جنوبگان شدند (۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

رحمان[۸] و همکاران ۱۱ جنس باکتریایی از خاک‌های آلوده بمبی در هند جداسازی کردندکه شامل: *Micrococcus*، *Corynebacterium*، *Flavobacterium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Moraxella*، *Alcaligenes*، *Enterobacter*، *Aeromonas*، *Vibrio* و *Acinetobacter* بودند (۱۶).

نیشا[۹] و همکاران از یک منطقهٔ آلودهٔ گازوئیلی در هند ۲ سویه از جنس *Staphylococcus*، یک سویه از جنس *Pseudomonas* و دو سویه از جنس *Bacillus* شناسایی شدند(۱۷). سیریک[۱۰] و همکاران از یک منطقهٔ آلوده در بریتانیا ۱۲ باکتری تجزیه‌کننده جداسازی کردند که مربوط به جنس‌های *Rhodococcus*، *Pseudomonas*، *Achromobacter*، *Psychrobacter* و *Acinetobacter* بود(۱۸). هونگ[۱۱] و همکاران از یک منطقهٔ آلوده در کره یه سویهٔ باکتریایی *Pseudomonas aeruginosa IU5* جداسازی کردند (۸).

در پژوهش حاضر تعداد ۳۴ سویهٔ باکتریایی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان خوزستان جداسازی شد. سویه‌های باکتریایی جداشده در این پژوهش به جنس‌های *Achromobacter*، *Enterobacter* و *Klebsiella* تعلق داشتند. این جنس‌های میکروبی تجزیه‌کننده با جنس‌هایی که پژوهشگران دیگر شرح داده‌اند، هم‌خوانی دارد. اما سویهٔ متعلق به جنس *Klebsiella* را تنها چمخا[۱۲] و همکاران از یک منطقه در جزایر قرقنه[۱۳] گزارش داده‌اند که توانایی تجزیه‌کنندگی هیدروکربن‌های آلیفاتیک نفت را دارد، و تاکنون توانایی تجزیه‌کنندگی گازوئیل این جنس باکتری گزارش نشده است (۱۹).

از روش‌های گوناگونی جهت بررسی میزان حذف گازوئیل توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده استفاده شده است. نیخی[۱۴] و همکاران از روش گراوی متری جهت سنجش تجزیهٔ گازوئیل استفاده کردند. این پژوهشگران حذف گازوئیل را در دوره‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روزه با این روش اندازه‌گیری کردند. اغلب پژوهشگران بر استفاده از روش کروماتوگرافی و اندازه‌گیری طیف‌های حاصل‌شده به‌عنوان بهترین و مطمئن‌ترین روش بررسی حذف گازوئیل تأکید دارند و در اکثر مقالات از این روش استفاده شده است (۶، ۱۹ و ۲۰).

در پژوهش حاضر از دو روش کیفی و کروماتوگرافی گازی جهت سنجش تجزیهٔ گازوئیل استفاده شد و مقایسهٔ نتایج حاصل از این دو روش هم‌خوانی آن‌ها را نشان داد. در این پژوهش بالاترین حذف گازوئیل پس از ۱۰ روز مربوط به سویهٔ *Enterobacter cloacae* strain *L2* (۷۲درصد) است که از حذف گازوئیل به‌دست‌آمده توسط پژوهشگرانی همچون هونگ و همکاران که از سویهٔ منفرد جهت تجزیهٔ گازوئیل استفاده کردند بالاتر است (۱۱).

حلالیت گازوئیل در آب، پایین است. بنابراین بایستی که باکتری‌ها باید برای جذب و استفاده از این ماده آب‌گریز مکانیسم‌هایی داشته باشند. هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی وتولید امولسیون‌کننده‌ها ممکن است دو مکانیسم برای جذب و تجزیهٔ بهتر گازوئیل در محیط‌های آبی باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه‌ای مستقیم بین هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی(E_{24}) و فعالیت امولسیون‌کنندگی (BATH) در تجزیهٔ زیستی گازوئیل وجود دارد. ازآنجایی‌که سویهٔ *L2* هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی و فعالیت امولسیون‌کنندگی بالایی دارد، می‌تواند گازوئیل را به‌مقدار زیاد و در غلظت‌های بالاتر در مقایسه با سایر سویه‌ها تجزیه کند؛ بنابراین نتایج اثبات کرد که وقتی یک سویهٔ باکتری،

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروفوبیسیتهٔ سطح سلولی بالایی دارد، می‌تواند امولسیون‌کننده‌های بیشتری تولید کند و تجزیهٔ زیستی گازوئیل را افزایش دهد. حسن شاهیان[۱۵] و همکاران یک رابطهٔ آشکار بین فعالیت امولسیون‌کنندگی، چسبندگی سلولی به هیدروکربن و سرعت رشد باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام در محیط نفت خام گزارش کردند (۱۰).

در این پژوهش باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ گازوئیلی از مناطق آلوده جداسازی شدند. این باکتری‌ها پس از شناسایی در جنس‌های متفاوتی از جمله: *Achromobacter*، *Enterobacter* و *Klebsiella* قرار گرفتند. این باکتری‌ها قابلیت بالای تجزیهٔ گازوئیل را نشان دادند. آن‌ها دارای خصوصیاتی همچون تولید بیوسورفکتانت و چسبندگی سطح سلولی بودند. نتایج نشان داد که این باکتری‌ها قابلیت تجزیهٔ زیستی در خاک‌های ایران را دارند و با به‌کاربردن این باکتری‌ها برای تصفیهٔ زیستی، می‌توان آلودگی‌های گازوئیلی را کاهش داد.

References

(1) 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.

(2) Durand JP, Béboulène JJ, Ducrozet A. Detailed characterization of petroleum products with capillary analyzers. *Analusis* 1995; 23: 481-483.

(3) Baker JM. Mangroove swamps and the oil Industry. *Oil and Petrochemical Pollution* 1982; 1(1): 5-22.

(4) Li XW, Liu ZP. Microbial biodegradation of petroleum hydrocarbon. *Acta Microbiology Sinica* 2002; 42: 764-767.

(5) Niazy Z, Hassanshahian M, Ataei A. Isolation and characterization of diesel-degrading Pseudomonas strains from diesel-contaminated soils in Iran (Fars province). *Pollution* 2016; 2(1): 68-75.

(6) Nikhi T, Deepa V, Rohan G, Satish B. Isolation, Characterization and Identification of Diesel Engine Oil Degrading Bacteria from Garage Soil and Comparison of their Bioremediation Potential. *International Research Journal of Environment Sciences* 2013; 2(2): 48-52.

(7) Marquez-Rocha FJ, Hernandez-Rodriguez,V, Teresalamela MA. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air and Soil Pollution* 2001; 128: 313–320.

(8) Hong JH, Kim J, Choi OK, Cho KS, Ryu HW. Characterization of a diesel degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa IU5*, isolated from oil-contaminated soil in Korea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21: 381–384.

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

(10) Hassanshahian M, Emtiazi G, Kermanshahi R, Cappello S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination* 2010; 19 (3): 277–291.

(11) Luo Q, Zhang JG, Shen XR, Fan ZQ, He Y, Hou DY. Isolation and characterization of marine diesel oil-degrading Acinetobacter sp. strain *Y2*. *Annals of Microbiology* 2013; 63: 633–640.

(12) Pruthi V, Cameotra SS. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techonology* 1997; 11: 671-674.

www.SID.ir

Archive of SID

(13) Batista SB, Mounteer A, Amorim FR, Totola MR. Isolation and characterization of biosurfactant bioemulsifier- producing bacteria frompetroleum contaminated sites. *Bioresource Technology* 2006; 97: 868-875.

(14) Shukor MY, Dahalan FA, Salvamani S, Jusoh A Z, Shamaan NA, Syed MA. Characterization of a diesel-degrading enzymes from *Acinetobacter* sp. strine *DYR12*. *Bioremediation Science and Technology Research* 2013; 76(2): 34-45.

(15) Shukor MY, Hassan AZ, Jusoh AZ, Perumal N, Shamaan NA, MacCormack WP, Syed MA. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica. *Journal Environmental Biology* 2009; 30(1): 1-6.

(16) Rahman PK, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Journal of Basic Microbiology* 2002; 42(4): 284-291.

(17) Nisha P, Nayana M, Varghese M. Degradation Studies on Diesel Oil Using Bacterial Consortium Isolated From Oil Polluted Soil. *Advanced Biotechnology* 2013; 13(2): 06-14.

(18) Ciric L, Philp JC, Whiteley AS. Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. *FEMS microbiology letters* 2010; 303:116–122.

(19) Chamkha M, Trabelsi Y, Mnif S, Sayadi S. Isolation and characterization of *Klebsiella oxytoca* strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field. *Journal of Basic Microbiology* 2011; 51(6): 580-589.

(20) 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]- Maharashtra
[2]- Gas Chromatography
[3]- Dichloromethane
[4]- Bacterial Adhesion To Hydrocarbon
[5]- Emulsification Activity
[6]- Luo
[7]- Shukor
[8]- Rahman
[9]- Nisha
[10]- Ciric
[11]- Hong
[12]- Chamkha
[13]- Kerkennah island
[14]- Nikhi
[15]- Hassanshahian

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and characterization of diesel-oil degrading bacteria from petroleum contaminated soil at Khozestan provenance

Mehdi Hassanshahian *
Associate Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, hasanshahi@gmail.com; mshahi@uk.ac.ir

Abstract

Introduction: Diesel oil is the major product of crude oil. This product is the main pollutant of environment and has hazardous effects on the environment. Bioremediation is the best method for remediation of this pollutant, because this method use nature potential for remediation and also this method has a low cost.

Materials and methods: In this study, for isolation of diesel-oil degrading bacteria sampling performed from contaminated regions. The prevalent diesel-oil degrading bacteria were identified by biochemical and molecular methods. Some properties in these bacteria were analyzed such as: hydrophobicity and emulsification activity. The percentage of diesel-oil degradation was assayed for each strain by Gas Chromatography (GC) and qualitative test.

Results: In this research 34 diesel-oil degrading bacteria were isolated. From these strains 10 strains were selected according to diesel-oil degradation. These strains belong to *Achromobacter*، *Enterobacter* and *Klebsiella*. The half percentages of diesel-oil were removed by these strains in 10 days of incubation. The best strain for degradation of diesel was *Enterobacter cloacae* strain L2 (72%). The highest hydrophobicity is related to *Klebsiella oxytoca* strain K2 (76%) and the best emulsification activity belongs to *Achromobacter denitrificans* strain B2 (58 %).

Discussion and conclusion: The results of this research confirmed that diesel degrading bacteria have sufficient diversity in soil contaminated in Iran. These bacteria have good potential for remediation of diesel pollution from soil.

Key words: Biodegradation, Bacteria, Diesel-oil, Khozestan, Pollution

* Corresponding author
Received: December 28, 2015 / **Accepted:** July 4, 2015

www.SID.ir