



Isolation and identification of crude oil-degrading bacteria from soil of some Khuzestan oil-rich regions

Esmaeel Ghasemi Goujani

* Assistant Professor, Department of Plant production and Genetics, Collage of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Khuzestan, Iran. Tel: +989378005535, Email: ghasemi@asnrukh.ac.ir

Zeinab Papi

MSc Graduated Student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant production and Genetics, Collage of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Khuzestan, Iran. Email: Zeinab.papi69@gmail.com

Ali Reza Shafeenia

Assistant Professor, Department of Plant production and Genetics, Collage of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Khuzestan, Iran. Email: shafeinia@alumni.ut.ac.ir

Khalil Alami Saeed

Associate Professor, Department of Plant production and Genetics, Collage of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Khuzestan, Iran. Email: khalilalamisaed@gmail.com

Bijan Khalili Moghadam

Associate Professor, Department of Soil Sciences, Collage of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Khuzestan, Iran. Email: moghaddam623@yahoo.ie

Abstract

Objective

In this research the ability of some bacteria isolated from oil contaminated areas in Khuzestan province in lowering oil contamination was studied.

Materials and methods

After primary isolation of some bacterial colonies with oil-degradation ability, eleven bacteria species called *Lysobacter ruishenii* strain CTN-1, *Kocuria rosea* strain CMS, *Bacillus pseudomycoloides* strain NBRC, *Delftia tsuruhatensis* strain 332, *Planomicrobium chinense* strain NBRC, *Acinetobacter junii* strain ATCC, *Cedecea lapagei* strain DSM, *Ochrobactrum intermedium* strain CNS, *Pseudomonas aeruginosa* strain SNP, *Chryseobacterium flavum* strain CW-E 2 and *Streptomyces novaecaes* strain NBRC via alignment of their 16S rRNA gene sequence with sequences existing in NCBI were identified. Then crude oil degradation ability of the bacteria and also their growth rate in liquid and solid minimum salt medium (MSM) containing 1 percent crude was measured.

Results

Although all of the isolated bacteria have the capability of crude oil degradation in different levels, *Planmicrobium chinense*, *Ochrobactrum intermedium* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria have higher growth rate and the degradation ability in the period of 15 days.

Conclusions

It seems that provided that doing some complementary researches, these bacteria can be used for decontamination of crude oil contaminated regions located in Khuzestan province.

Keywords: Contamination, Crude oil-degrading bacteria, Bioremediation, Environment.

Citation: Ghasemi Goujani E, Papi Z, Shafeenia AR, Alami Saeed Kh, Khalili Moghadam B (2019) Isolation and identification of crude oil-degrading bacteria from soil of some Khuzestan oil-rich regions. *Agricultural Biotechnology Journal* 11 (2), 37-56.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 37-56.

DOI: 10.22103/jab.2019.13216.1097

Received: March 11, 2019; Accepted: June 26, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از خاک برخی نواحی نفتی خوزستان

اسماعیل قاسمی گوجانی

* نویسنده مسئول، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، خوزستان، ایران. تلفن: ۰۹۳۷۸۰۰۵۵۳۵، ایمیل: ghasemi@asnrukh.ac.ir.

زینب پاپی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، خوزستان، ایران. ایمیل: Zeinab.papi69@gmail.com

علیرضا شافعی نیا

استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، خوزستان، ایران. ایمیل: shafeinia@alumni.ut.ac.ir

خلیل عالمی سعید

دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، خوزستان، ایران. ایمیل: khalilalamisaed@gmail.com

بیژن خلیلی مقدم

دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، خوزستان، ایران. ایمیل: moghaddam623@yahoo.ie

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵

چکیده

هدف: در این مطالعه توانایی باکتری‌های جداسازی شده از برخی نواحی آلوده به نفت خام واقع در استان خوزستان در از بین بردن آلودگی‌های نفتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از مراحل غنی‌سازی، جداسازی و غربالگری اولیه، بر اساس توالی ژن کد کننده 16S rRNA، ۱۱ باکتری متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Kocuria rosea* strain CMS، *Lysobacter ruishenii* strain CTN-1، *Planomicrobium chinense* strain Delftia tsuruhatensis strain 332، *pseudomycooides* strain NBRC، *Ochrobactrum*، *Cedecea lapagei* strain DSM، *Acinetobacter junii* strain ATCC، NBRC، *Chryseobacterium flavum* strain، *Pseudomonas aeruginosa* strain SNP، *intermedium* strain CNS و *CW-E 2* و *Streptomyces novaecaes* strain NBRC شناسایی گردیدند. در مرحله بعد میزان تخریب نفت خام در محیط کشت نمکی حداقل (MSM) جامد و مایع حاوی ۱ درصد نفت خام اندازه‌گیری شد.

نتایج: براساس نتایج حاصل از سه نوع آنالیز مختلف مشخص گردید که کلیه باکتری‌های جداسازی شده در این پژوهش قابلیت تخریب نفت خام را به میزان مختلف دارا می‌باشند ولی از بین آنها باکتری‌های *Planmicrobium chinense*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Ochrobactrium intermedium*، نسبت به سایر باکتری‌های جداسازی شده در این پژوهش دارای نرخ رشد بالاتر و نیز میزان تخریب بیشتر در مدت زمان ۱۵ روز بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی، زیست پالایی به وسیله باکتری‌های جداسازی شده در این پژوهش می‌تواند گزینه مناسبی جهت پاکسازی نواحی آلوده استان خوزستان باشد.

کلمات کلیدی: آلودگی، باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، زیست پالایی، محیط زیست.

مقدمه

هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یکی از مواد شیمیایی سمی و خطرناک در صنایع پتروشیمی می‌باشند که به صورت ناخواسته یا آگاهانه وارد محیط زیست ما شده‌اند (Varjani et al. 2015). ماهیت این مواد و تداوم حضور آن‌ها در طبیعت منجر به تغییرات کیفی در ویژگی‌های فیزیکی، بیوشیمیایی و بیولوژیکی خاک می‌گردد. از سوی دیگر سمیت ترکیبات موجود در نفت خام، رشد گیاهان در خاک منطقه آلوده را نیز تحت شعاع قرار می‌دهد (Margesin et al. 2003; Roy et al. 2014). اگر چه هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک ممکن است به صورت طبیعی و البته به میزان جزئی در اثر اکسیداسیون شیمیایی، نور خورشید، تبخیر و همچنین جذب توسط ذرات خاک و رسوبات حذف گردند، ولی حذف مؤثر این آلاینده‌ها از خاک نیازمند به‌کارگیری روش‌های مصنوعی مانند روش‌های فیزیکی، شیمیایی، حرارتی و بیولوژیکی است. به‌طور کلی استفاده از روش‌های بیولوژیک برای حذف آلاینده‌های نفتی از مکان‌های آلوده به نفت خام در مقایسه با سایر روش‌ها کارآمدتر، اقتصادی‌تر و سالم‌تر است (Zhang et al. 2012). زیست پالایی به طور گسترده به عنوان یکی از روش‌های موفق و مقرون به صرفه برای از بین بردن آلودگی‌های نفتی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Abed et al. 2014). در میان روش‌های زیستی، استفاده از باکتری‌ها برای حذف

آلودگی‌های ناشی از نفت خام بازدهی بسیار خوبی دارد (Bragg et al. 1994). لازم به ذکر است که علاوه بر باکتری‌ها، قارچ‌ها نیز دارای توانایی متابولیکی استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود می‌باشند. در واقع متوسط میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی به‌وسیله قارچ‌ها (۶-۸۲ درصد) می‌تواند از باکتری‌ها (۱۳-۵۰ درصد) بیشتر باشد. اما به دلایلی مانند فراوانی زیاد، سرعت رشد بالاتر و همچنین توانایی استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها، باکتری‌ها نماینده مناسب‌تری برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی می‌باشند (Wolicka et al. 2009). علاوه بر این، استفاده از باکتری‌ها برای پاکسازی آلودگی‌های نفتی بر خلاف سایر روش‌ها که دارای تاثیر کوتاه مدت هستند، دارای تاثیر دایمی می‌باشند که این امر مهم‌ترین جنبه مثبت این سازوکار است (Schwab & Banks, 1994). براساس پژوهش‌های متعدد سویه‌های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی‌های نفتی مقاوم هستند بلکه برخی از آنها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند، در ضمن باکتری‌ها و سایر موجودات زنده ذره‌بینی خاک قادرند با ذخیره عناصر سنگین و ترکیبات سمی دیگر از تجمع بالای آن در گیاه و ورود آنها به سیستم بدن انسان جلوگیری کنند. با کاهش شمار این موجودات زنده ذره‌بینی میزان تجمع عناصر سنگین و سمی در گیاه افزایش یافته و این می‌تواند تهدیدی برای زندگی بشر باشد (Riley & Chavan 2007). اگرچه مناطق نفت‌خیز مانند استان خوزستان از خسارات ناشی از این آلاینده بی‌نصیب نمانده‌اند ولی از سوی دیگر امکان وجود باکتری‌های تخریبگر در این مناطق بیشتر از سایر مکان‌ها است. این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تخریب کننده نفت از خاک مناطق آلوده به نفت و اندازه‌گیری سطح تخریب نفت خام توسط باکتری‌های جداسازی شده در محیط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌ها: نمونه‌برداری در فاصله زمانی بین ۹۴/۲/۵ تا ۹۴/۲/۲۸ از اطراف

چاه شماره ۱ مسجد سلیمان، چاه شماره ۸ زیلابی، منطقه آزاد اروند، لالی و دزفول صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به صورت جداگانه در کیسه‌های نایلونی تمیز قرار گرفته و روی یخ به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد (Subathra et al. 2013) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل گردیدند. نمونه خاک‌های مذکور تا زمان شروع آزمایش با اسپری حاوی آب مقطر مرطوب گردیدند تا رطوبت مورد نیاز باکتری‌های موجود در خاک تامین گردد. بهترین زمان برای شروع آزمایش ۲۴ ساعت تا ۴۸ ساعت بعد از نمونه‌برداری است زیرا در این زمان تعداد ارگانیزم‌های موجود در خاک حداکثر است.

به منظور رشد باکتری‌های متحمل به نفت خام، میزان ۱ گرم از هر نمونه خاک به صورت جداگانه در ارلن‌های حاوی ۱۰۰

میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱٪ نفت خام سترون کشت شد. اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت حداقل معدنی^۱ (MSM) شامل ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۱ گرم (NH₄)SO₄، ۰/۰۲۵ گرم MgSO₄.7H₂O، ۰/۲ گرم NaNO₃، ۰/۴ گرم KH₂PO₄ و ۱ گرم

^۱Mineral Salts Medium

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH محیط کشت بین ۷-۸) بود. در مرحله بعد به منظور غنی‌سازی کشت‌های انجام شده، به مدت ۳ هفته و هر هفته ۱۰ درصد از کشت قبلی در محیط کشت جدید واگشت و در دمای ۳۰ درجه و دور ۱۲۰ rpm قرار داده می‌شد (Xu et al. 2013; Tanase et al. 2013).

میزان ۱۵ میکرولیتر از کشت‌های غنی‌سازی شده بر روی پلیت حاوی محیط کشت MSMA^۲ جامد حاوی ۱ درصد نفت خام منتقل و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مشاهده کلنی‌ها بر روی محیط کشت، مرحله خالص‌سازی کلنی‌های به‌دست آمده بر روی محیط کشت LB^۳ جامد انجام شد.

تشخیص پتانسیل تخریب توسط کلنی‌های جداسازی شده (اندازه‌گیری قطر منطقه تخریب): پس از

خالص‌سازی باکتری‌های جداسازی شده در مرحله قبل، از هر یک از آن‌ها کشت مایع LB^۲ با OD مشخص ۰/۵ تهیه گردید. سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر کشت مایع حاوی باکتری‌ها خالص شده بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MSMA همراه با ۱ درصد نفت خام و نیز بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت LB قرار گرفتند و به ترتیب به مدت ۱۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. باکتری‌هایی که قادر به رشد در هر دو محیط بودند به عنوان باکتری تخریبگر انتخاب گردیدند (Malboobi et al. 2009; Subathra et al. 2013). پس از گذشت ۱۵ روز، قطر منطقه تخریب بر روی محیط MSMA برای هر باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و یازده تیمار (شامل باکتری‌های منتخب) اندازه‌گیری و باکتری‌هایی که بیشترین تخریب را داشتند برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

اندازه‌گیری سرعت رشد: ۱۰ میکرولیتر از کشت مایع حاوی باکتری خالص شده با OD مشخص ۰/۵، در ارلن‌های

۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM و نیز ۱ درصد نفت خام کشت به عنوان منبع کربن کشت و به همراه نمونه شاهد (که فقط حاوی محیط کشت و نفت خام بود) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار داده شدند. میزان رشد توده‌های میکروبی کشت شده از طریق بررسی میزان کدورت ایجاد شده در نمونه‌ها ارزیابی گردید. مقدار کدورت حاصل از رشد باکتری‌ها از طریق میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری‌ها در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳ و ۱۵ روز پس از کشت انجام شد (Subathra et al. 2013).

اندازه‌گیری قدرت تخریب: هر یک از باکتری‌ها همانند مرحله قبل کشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی

با سه تکرار و یازده تیمار شامل باکتری‌های منتخب انجام شد. بعد از گذشت ۱۵ روز از کشت باکتری‌ها در محیط کشت حاوی نفت خام، باقیمانده نفت خام موجود در ارلن‌ها با استفاده از کلروفرم استخراج (Al-Wasify & Hamed 2014) و میزان حذف نفت خام به وسیله روش وزن سنجی اندازه‌گیری گردید. از آنجایی که بخشی از کاهش نفت خام موجود در نمونه‌ها به دلیل تبخیر آن

^۲Mineral Salts Medium-Agar

^۳Luria Bertani

است، برای اندازه‌گیری قدرت تخریب نفت خام توسط هر یک از باکتری‌ها، غلظت نفت خام باقیمانده در هر یک از نمونه‌ها با نمونه شاهد فاقد باکتری مقایسه شد. در ضمن به منظور جلوگیری از تخریب نوری نفت خام، نمونه‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند. میزان تجزیه بیولوژیکی با استفاده از روش وزن سنجی به صورت زیر محاسبه شد:

وزن نفت باقیمانده: وزن ظرف همراه با نفت خام - وزن ظرف خالی

مقدار تخریب نفت: وزن اولیه نفت اضافه شده به محیط - وزن نفت باقیمانده

درصد تخریب: مقدار تخریب نفت خام $\times 100$ (Subathra et al. 2013).

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک: از تجزیه و تحلیل توالی ژن کد کننده 16S rRNA به منظور تعیین

خصوصیات رده‌بندی کلنی‌های جداسازی شده، استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA کلنی‌های جداسازی شده با استفاده از روش CTAB استخراج شد (Winnepenninckx et al. 1993) سپس با استفاده از DNA استخراجی و بوسیله آغازگرهای عمومی رفت (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و برگشت (3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5') 27F و برگشت (5'-14592R توالی ژن کد کننده 16SrRNA (Weidner et al. 1996) تکثیر شد. اجزاء واکنش PCR شامل 100 نانوگرم DNA الگو، 2/5 میکرولیتر بافر 10X، 0/1 میلی مولار dNTP، 1 میکرومولار آغازگر رفت، 1 میکرومولار آغازگر برگشت، 1 واحد Taq polymerase و 17/8 میکرولیتر آب مقطر استریل بود. چرخه دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و در ادامه 30 چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 53 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و سنتز در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه بود. تکثیر تحت شرایط فوق موجب تکثیر یک قطعه به طول 1500 جفت باز شد. پس از خالص‌سازی قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت Gene All، قطعات به منظور تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردیدند. در نهایت توالی‌های بدست آمده بوسیله برنامه Blastn پایگاه داده NCBI با سایر توالی‌ها مقایسه گردید.

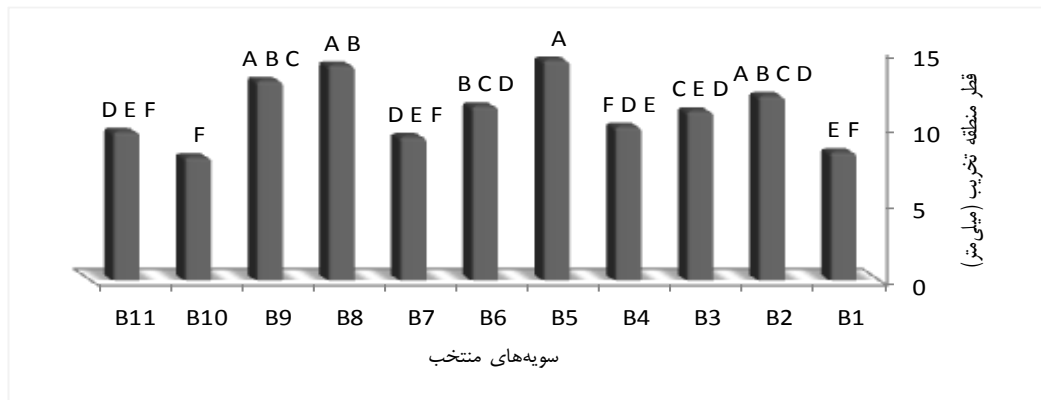
به منظور رسم درخت فیلوژنتیک، توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI همتراز و آنهایی که شباهت بالای 97٪ را نشان دادند شناسایی و سپس با استفاده از نرم افزار MEGA6.06 درخت فیلوژنتیک براساس روش Neighbor-joining با ارزش بوت استرپ 1000 تکرار رسم گردید.

نتایج

جداسازی: در بررسی حاضر 83 کلنی مختلف از محیط کشت‌های غنی‌سازی شده حاوی نفت خام جداسازی گردید که از

بین آنها 11 کلنی باکتریایی با بیشترین نرخ رشد و قطر منطقه تخریب در محیط MSMA، برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند.

تشخیص پتانسیل تخریب توسط سوبه‌های جداسازی شده (اندازه‌گیری قطر منطقه تخریب): براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به قطر منطقه تخریب توسط کلنی‌های خالص‌سازی شده، بین کلنی‌های مورد مطالعه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین قطر منطقه تخریب هر کلنی (شکل ۱) نشان داد که، کلنی B5 با قطر منطقه تخریب ۱۴/۳۳ میلی‌متر بیشترین و B10 با قطر منطقه تخریب ۸ میلی‌متر کمترین قطر منطقه تخریب را دارا بودند.



شکل ۱. مقایسه میانگین قطر منطقه تخریب کلنی‌ها

Figure 1. Comparison of the average diameter of clearance zone

جدول ۱. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به قطر منطقه تخریب توسط کلنی‌ها

Table 1. Variance analysis results of clearance zone diameter

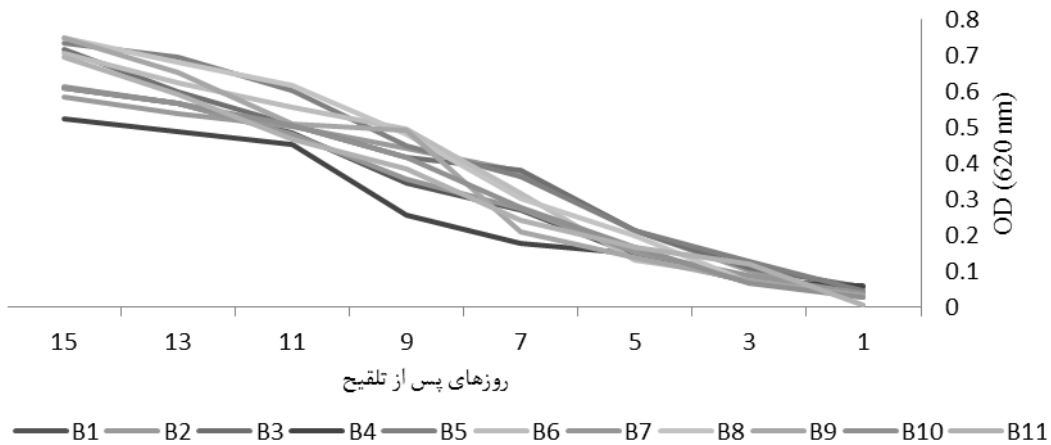
| MS | Df | |
|----------|----|------------------|
| 14.066** | 10 | تیمار Treatment |
| 2.33 | 22 | خطا Error |
| 13.88 | | ضریب تغییرات C.V |

** indicate significant at level 1%

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد.

اندازه‌گیری سرعت رشد: نتایج سنجش کدورت در یک دوره زمانی ۱۵ روزه و در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳ و ۱۵ پس از کشت ثبت گردید. با توجه به بررسی روند رشد باکتری‌ها در دوره زمانی مذکور (شکل ۲) بیشترین افزایش در میزان جذب نوری از روز اول نمونه برداری تا روز پانزدهم بعد از نمونه برداری مربوط به کلنی B8 و کمترین مقدار مربوط به کلنی B4 بود. از

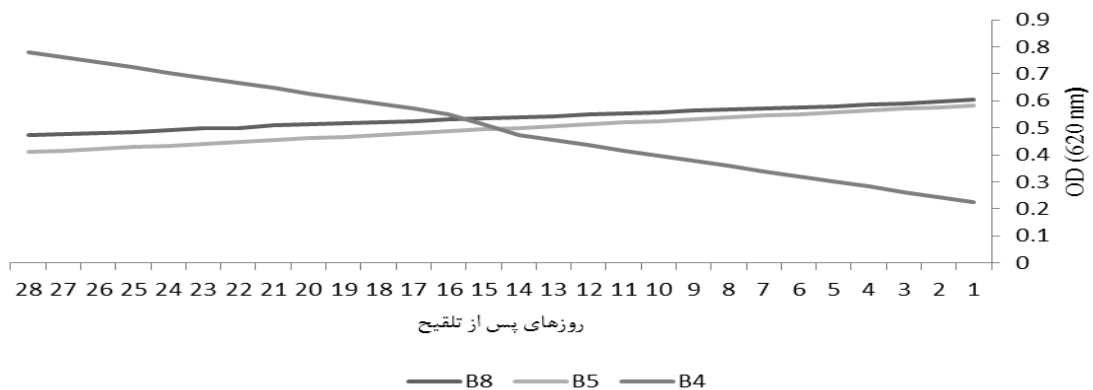
این مطلب می‌توان نتیجه گرفت که همه باکتری‌های مزبور قادر به تجزیه نفت خام و استفاده از آن به‌عنوان منبع کربن می‌باشند که نتیجه آن افزایش در جمعیت باکتری و جذب درصد نور بیشتر است.



شکل ۲. روند رشد باکتری‌ها طی مدت زمان ۱۵ روز

Figure 2. The process of bacterial growth over a period of 15 days

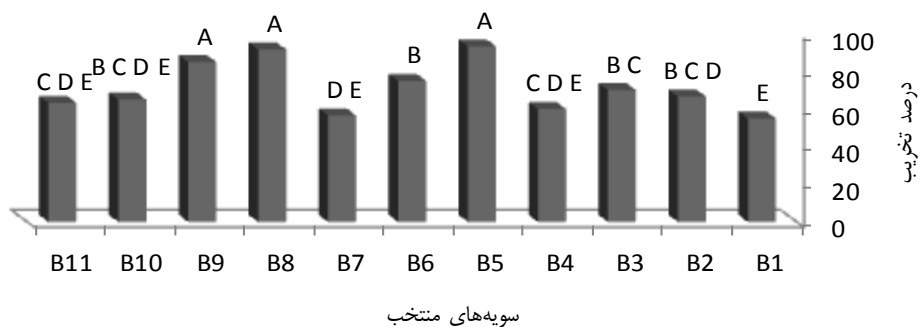
بررسی سرعت رشد نسبی (شکل ۳) باکتری‌هایی که بیشترین سرعت رشد و کمترین سرعت رشد را داشتند در یک بازه زمانی ۳۰ روزه نشان داد که سرعت رشد نسبی کلنی B4 (که دارای کمترین میزان سرعت رشد در بازه زمانی ۱۵ روزه بود) در حال افزایش است ولی سرعت رشد نسبی کلنی‌های B5 و B8 (که بیشترین نرخ سرعت رشد در بازه زمانی ۱۵ را نشان داده بودند) روند کاهشی دارد.



شکل ۳. بررسی سرعت رشد نسبی باکتری‌های مورد مطالعه در بازه زمانی ۳۰ روز

Figure 3. Study of bacteria relative growth rate over a period of 30 days

اندازه گیری قدرت تخریب: نتایج تجزیه واریانس تخریب نفت خام نشان می‌دهد که کلنی‌های انتخابی از نظر قدرت تخریب نفت خام در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم دارند. با توجه به نمودار مقایسه میانگین تخریب نفت خام کلنی‌های انتخابی (شکل ۵)، بیشترین میزان تخریب به ترتیب با ۹۳/۳۳، ۹۱/۶۶ و ۸۵ درصد مربوط به کلنی‌های B5، B8 و B9 و کمترین میزان تخریب با ۵۵ درصد مربوط به کلنی B1 بود.



شکل ۴. مقایسه میانگین مربوط به میزان تخریب نفت خام توسط کلنی‌ها

Figure 4. Comparison of Average Crude Oil Degradation by colonies

جدول ۲. تجزیه واریانس مربوط به تخریب نفت خام کلنی‌ها

Table 2. Variance analysis results of Crude Oil Degradation of colonies

| MS | Df | |
|----------|----|------------------|
| 550.45** | 10 | تیمار Treatment |
| 33.33 | 22 | خطا Error |
| 8.12 | | ضریب تغییرات C.V |

** indicate significant at level 1%

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد.

بررسی همبستگی بین سرعت رشد، قدرت تخریب و قطر منطقه تخریب باکتری‌ها: بررسی قدرت تخریب در محیط مایع و قطر منطقه تخریب در محیط جامد نسبت به هم همبستگی ۹۱ درصدی را نشان داد (جدول ۳) بدین معنی که باکتری‌هایی که در محیط مایع قدرت تخریب بالاتری دارند قادر به ایجاد قطر منطقه تخریب بزرگتری در محیط جامد نیز می‌باشند.

سرعت رشد باکتری‌های مورد مطالعه ۱۵ روز پس از کشت در محیط مایع همبستگی ۷۹ درصدی با قدرت تخریب آن‌ها در محیط مایع و در همین بازه زمانی را نشان داد (جدول ۳). به همین دلیل شاخص تخریب به ازای رشد برای هر یک باکتری‌ها به منظور تعیین رابطه بین سرعت رشد در محیط مایع و قدرت تخریب در محیط مایع اندازه گیری گردید (جدول ۴).

جدول ۳. بررسی باکتری‌ها از نظر همبستگی بین سرعت رشد، قدرت تخریب و قطر منطقه تخریب

Table 3. Study of correlation between Bacteria Growth Rate, Degradation Power and Clearance Zone diameter

| | سرعت رشد Growth Rate | قدرت تخریب Degradation Strength | قطر منطقه تخریب Clearance Zone diameter |
|---|-------------------------|---------------------------------------|---|
| سرعت رشد Growth Rate | 1 | 0.789 | 0.649 |
| قدرت تخریب Degradation Strength | 0.789 | 1 | 0.911 |
| قطر منطقه تخریب Clearance Zone diameter | 0.649 | 0.911 | 1 |

بررسی شاخص قدرت تخریب در محیط مایع به ازای رشد در محیط مایع برای هر باکتری نشان داد که درمورد سه باکتری B5، B8 و B9 با سرعت رشد بالاتر شاخص قدرت تخریب بالاتری نیز دیده شد این درحالی بود که درمورد باکتری‌ها با سرعت رشد متوسط و پایین‌تر رابطه چندانی بین سرعت رشد و قدرت تخریب وجود نداشت. سرعت رشد باکتری‌ها در محیط مایع طی ۱۵ روز با قطر منطقه تخریب هر یک از آن‌ها در محیط جامد در زمان نامبرده همبستگی ۶۵ درصدی نشان داد (جدول ۳). بررسی همبستگی بین شاخص قطر منطقه تخریب در محیط جامد و سرعت رشد در محیط مایع برای هر باکتری نشان داد که بین رشد در محیط مایع و قطر منطقه تخریب در محیط جامد رابطه چندانی وجود ندارد.

شناسایی مولکولی و رسم درخت فیلوژنتیک: رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA6.06 و به روش Neighbor-joining و با ارزش بوت استرپ ۱۰۰۰ انجام شد. توالی‌های به دست آمده از کلنی‌های B1، B6 و B10 با ۹۷ درصد شباهت، توالی‌های به دست آمده از کلنی‌های B3، B4، B5، B7 و B9 با ۹۸ درصد شباهت و توالی‌های به دست آمده از کلنی‌های B2 و B8 با ۹۹ درصد شباهت، در کنار هم در یک گروه قرار گرفتند. همچنان که در شکل ۵ مشخص گردیده است.

جدول ۴. بررسی شاخص سرعت رشد در محیط مایع به ازای قدرت تخریب در محیط مایع

Table 4. Investigation of Growth Rate Index in liquid medium versus Degradation Strength in liquid medium

| سویه منتخب | شاخص سرعت رشد به قدرت تخریب | شاخص سرعت رشد به قطر منطقه تخریب |
|-----------------|--|--|
| Selected strain | Index of Growth Rate to Degradation Strength | Index of Growth Rate to Clearance Zone |
| B1 | 89.186 | 13.616 |
| B2 | 113.83 | 20.489 |
| B3 | 97.737 | 15.243 |
| B4 | 92.542 | 19.046 |
| B5 | 126.697 | 19.456 |
| B6 | 106.282 | 15.588 |
| B7 | 92.542 | 15.242 |
| B8 | 121.951 | 18.625 |
| B9 | 113.132 | 17.303 |
| B10 | 105.978 | 13.043 |
| B11 | 90.869 | 13.588 |

کلنی‌های B1، B6، B10 و B11 به ترتیب بیشترین شباهت را با *Lysobacter ruishenii* strain CTN-1

Streptomyces و *Chryseobacterium flavum* strain CW-E 2 *Acinetobacter junii* strain ATCC

Bacillus pseudomycooides (شکل A-۵)، کلنی‌های B3، B4، B5، B7 و B9 به ترتیب با

Cedecea *Planomicrobium chinense* strain DX₃-12 *Delftia tsuruhatensis* strain T7 strain NBRC

Pseudomonas aeruginosa strain SNP و *lapagei* strain DSM (شکل B-۵) و کلنی‌های B2 و B8 به ترتیب با

Ochrobactrum intermedium strain CNS و *Kocuria rosea* strain DSM (شکل C-۵) نشان دادند.

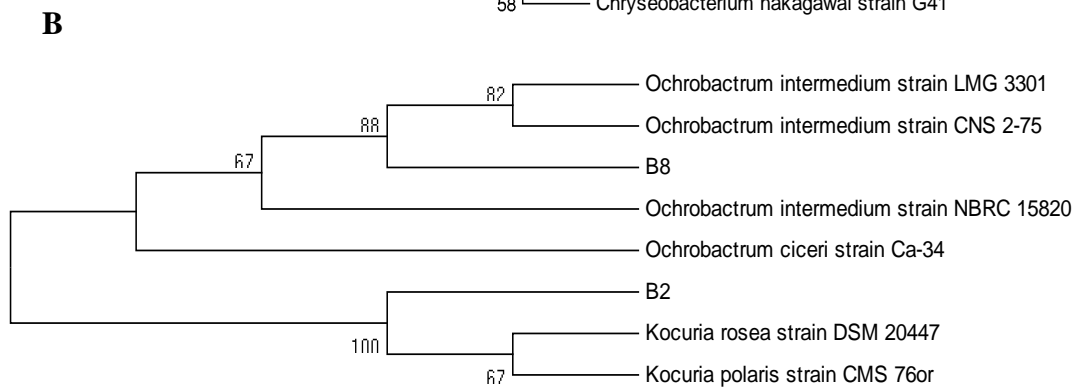
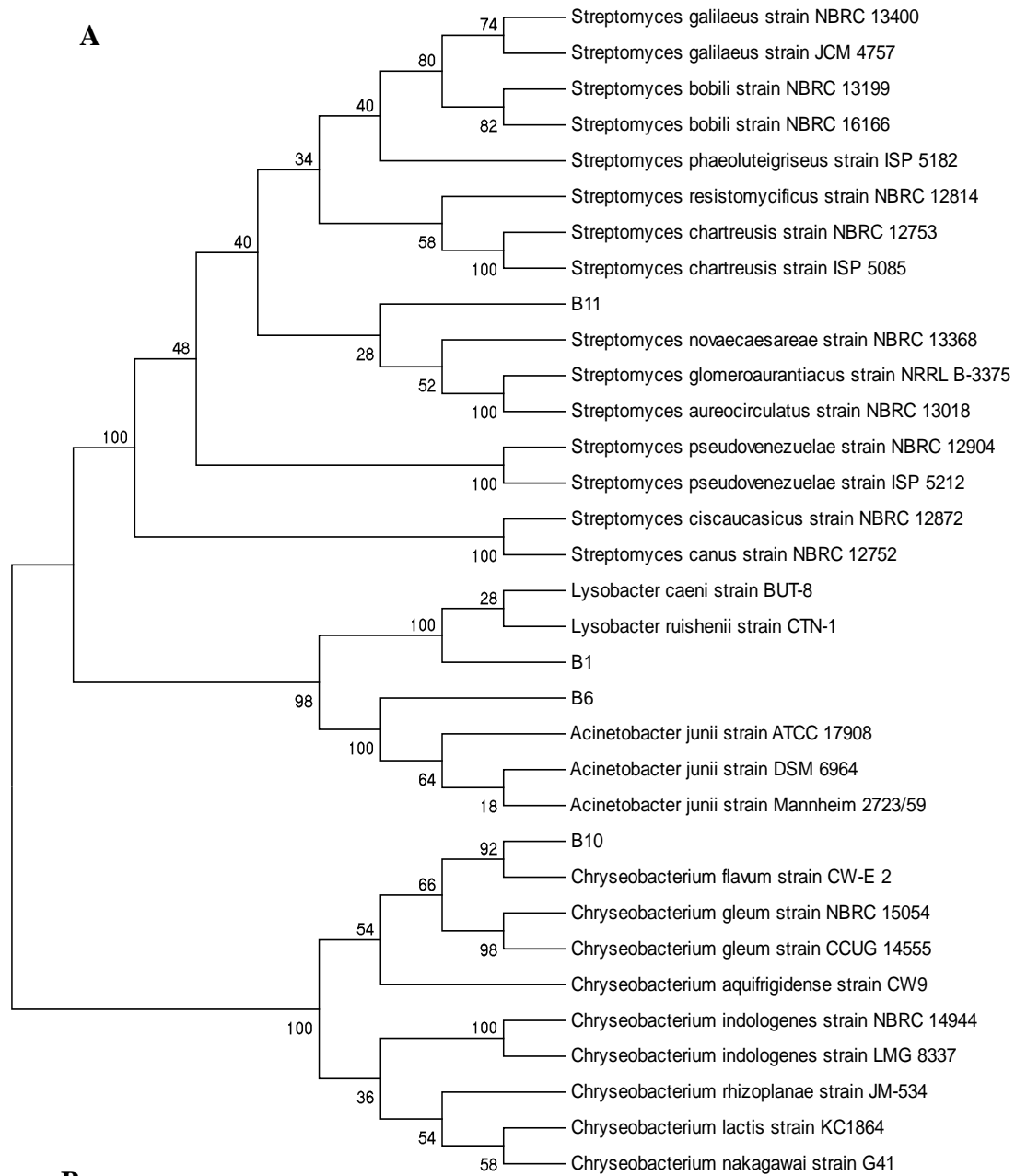
جدول ۵. نتایج حاصل از همترازی توالی قطعات تکثیر شده

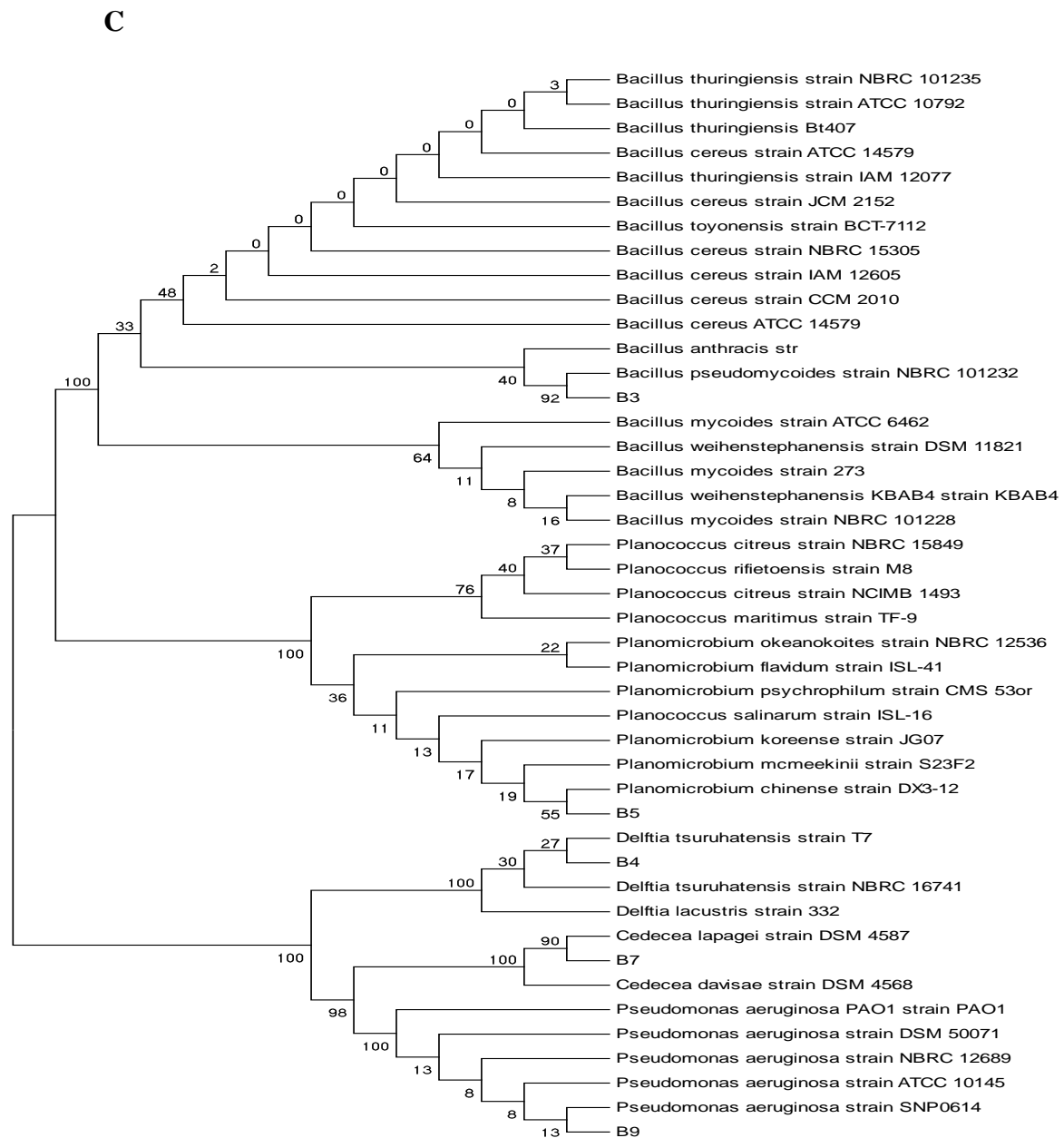
Table 5. The results related to alignment of amplified fragment sequences

| سویه منتخب Selected strain | سویه با بیشترین میزان شباهت Strain with the most similarity | Accession No. | درصد شباهت %Similarity |
|-------------------------------|--|---------------|---------------------------|
| B1 | <i>Lysobacter ruishenii</i> strain CTN-1 | NR_117432.1 | 97 |
| B2 | <i>Kocuria polaris</i> strain CMS | NR_028924.1 | 99 |
| B3 | <i>Bacillus pseudomycoides</i> strain NBRC | NR_113991.1 | 98 |
| B4 | <i>Delftia lacustris</i> strain 332 | NR_116495.1 | 99 |
| B5 | <i>Planomicrobium chinense</i> strain NBRC | NR_113593.1 | 98 |
| B6 | <i>Acinetobacter junii</i> strain ATCC | NR_117623.1 | 97 |
| B7 | <i>Cedecea lapagei</i> strain DSM | NR_126317.1 | 98 |
| B8 | <i>Ochrobactrum intermedium</i> strain NBRC | NR_113812.1 | 99 |
| B9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PAO1 | NR_074828.1 | 98 |
| B10 | <i>Chryseobacterium flavum</i> strain CW-E 2 | NR_115957.1 | 97 |
| B11 | <i>Streptomyces canus</i> strain NBRC | NR_112259.1 | 97 |

بحث

در پژوهشی (2015) Udgire et al. به ارزیابی قابلیت باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* و بومی هند برای حذف نفت خام در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. آنها قطر منطقه تخریب ایجاد شده طی مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد توسط این باکتری‌ها را بین ۷/۶۷ تا ۱۱ میلیمتر تخمین زدند. همچنین میزان تخریب نفت خام را پس از ۲۱ روز کشت در محیط مایع و با شرایط دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و دو غلظت ۱ و ۱۰ درصد نفت خام به ترتیب ۶۶ و ۵۸ درصد محاسبه نمودند. محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش نوترینت آگار حاوی نفت خام بود که یک محیط کامل برای کشت باکتری است. این در حالی است که محیط کشت مورد استفاده در پژوهش حاضر محیط حداقل بود که به جز نفت خام منبع کربن دیگری در آن وجود نداشت.





شکل ۵. درخت فیلوژنتیک باکتریهای جداسازی شده (A) درخت فیلوژنتیک باکتریهای B11، B1، B6 و B10 و (B) درخت فیلوژنتیک باکتریهای B2 و B8 در سطح ۹۹ درصد شباهت. (C) درخت فیلوژنتیک باکتریهای B3، B4، B5، B7 و B9 در سطح ۹۸ درصد شباهت

Figure 5. Phylogenetic tree of isolated bacteria. (A) The phylogenetic pattern of B11, B1, B6 and B10 bacteria. (B) Phylogenetic pattern of B2 and B8 bacteria. (C) The phylogenetic pattern of the bacteria B3, B4, B5, B7 and B9

در نتیجه با توجه به انتخاب شرایط سخت‌تر برای رشد باکتری‌ها، انتظار می‌رود قطر منطقه تخریب و قدرت تخریب باکتری *Bacillus* جداسازی شده در پژوهش حاضر کمتر از پژوهش Udgire et al. (2015) باشد. این موضوع در مورد قطر منطقه تخریب صدق می‌کند ولی قدرت تخریب باکتری *Bacillus* جداسازی شده در پژوهش حاضر در مدت زمان ۱۵ روز در محیط حاوی ۱ درصد نفت خام نسبت به قدرت تخریب باکتری جداسازی شده در پژوهش Udgire et al. (2015) در مدت زمان ۲۱ روز بیشتر بود. این احتمال وجود دارد که تفاوت مشاهده شده در اثر تفاوت در گونه‌های *Bacillus* مختلف جداسازی شده در این دو پژوهش و همچنین شرایط متفاوت کشت از جمله دما باشد. در سال ۲۰۱۵ Hanafy et al. باکتری *Pseudomonas sp* را از سواحل دریای سرخ عربستان سعودی جداسازی و سپس قدرت تخریب نفت این باکتری را بعد از گذشت مدت زمان ۱۴ روز در محیط کشت بوشن-هاس^۴ حاوی ۱ درصد نفت خام، ۹۵ درصد تخمین زدند. از سوی دیگر میزان تخریب نفت خام باکتری *Pseudomonas* به دست آمده در پژوهش حاضر ۱۵ روز پس از کشت، ۸۵ درصد تخمین زده شد. به نظر می‌رسد علت تفاوت اندک در نتایج این دو آزمایش، مشخص نبودن گونه باکتری در پژوهش فوق و همچنین تفاوت در روش تخمین میزان قدرت تخریب است.

در پژوهشی دیگر Subathra et al. (2013) ۱۱۳ باکتری را از مناطق آلوده به نفت سواحل شمال شرقی چنای واقع در هند^۵ جداسازی نمودند. پس از اندازه‌گیری قطر منطقه تخریب، چهار باکتری با بیشترین قطر ناحیه تخریب، برای انجام مراحل بعدی انتخاب گردیدند. از این چهار باکتری دو تا متعلق به جنس *Pseudomonas* و دو باکتری دیگر متعلق به جنس *Bacillus* بودند. ۱۴ روز پس از کشت روی محیط حاوی ۱ درصد نفت خام، قطر منطقه تخریب برای هر کدام از باکتری‌ها به ترتیب ۱۱، ۱۰، ۹ و ۸ میلیمتر، OD به ترتیب ۰/۸۴، ۰/۷۸، ۰/۷۱ و ۰/۷۴ در ۶۲۰ نانومتر به عنوان شاخص سرعت رشد و قدرت تخریب به ترتیب ۲۵، ۱۰، ۱۵ و ۱۵ درصد به دست آمد. مقایسه نتایج این پژوهش با پژوهش حاضر نشان می‌دهد که باکتری‌های جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* جداسازی شده در پژوهش سوباترا سرعت رشد بالاتر و قدرت تخریب پایین‌تری نسبت به باکتری‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر داشتند. بنابراین به نظر می‌رسد چون باکتری‌های جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* جداسازی شده در پژوهش حاضر علی‌رغم حضور در مرحله رشد لگاریتمی، درصد تخریب بالاتری در واحد زمان نشان دادند، برای انجام عمل زیست‌پالایی مناسب‌تر می‌باشند.

در پژوهش Wang et al. (2015) یازده گونه باکتری متعلق به مناطق سردسیر را از لجن‌های نفتی جداسازی شد. از بین آنها سه گونه متعلق به جنس‌های *Chryseobacterium*، *Bacillus* و *Pseudomonas* با توانایی بالا در تجزیه نفت خام برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. میزان تخریب نفت خام این باکتری‌ها پس از گذشت ۸ روز و تحت شرایط دمای ۱۰ درجه سانتیگراد، pH=۷، غلظت نمک ۱۰ گرم بر لیتر و غلظت نفت خام ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۶۲/۳، ۶۱/۶ و ۶۰/۹ درصد برآورد شد. علاوه بر این بررسی نمودار رشد این سه باکتری نشان داد که هر سه باکتری تقریباً در روز ۹-۷ به رشد لگاریتمی رسیده

^۱Bushnell_Haas^۲Chennai, Tamil Nadu, India

و از آن به بعد هیچ گونه رشدی مشاهده نشد. همان گونه که مشاهده می شود سرعت رشد و میزان تخریب این سه باکتری با باکتری های هم جنس جداسازی شده در پژوهش حاضر متفاوت است. این تفاوت می تواند به علت تفاوت در گونه های باکتریای جداسازی شده است.

از بررسی میزان همبستگی بین سرعت رشد باکتری ها در محیط مایع و درصد تخریب در محیط مایع این نتیجه حاصل گردید که همبستگی بیشتری بین این دو نسبت به سرعت رشد در محیط مایع و قطر منطقه تخریب در محیط جامد وجود دارد (جدول ۳) که این امر ممکن است به علت سرعت رشد متفاوت باکتری ها در محیط مایع نسبت به جامد باشد، (باید به این نکته توجه نمود که باکتری ها در محیط مایع قادر به رشد در همه جهات می باشند ولی در محیط جامد باکتری ها به صورت سطحی رشد می نمایند). این احتمال وجود دارد که همبستگی کمتر میان سرعت رشد در محیط مایع و قطر منطقه تخریب در محیط جامد نسبت به سرعت رشد در محیط مایع و قدرت تخریب در محیط مایع در اثر اختلاف در نحوه رشد در محیط جامد و مایع نسبت به هم باشد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، سه باکتری *Ochrobactrum planimicrobium chinense*، *Pseudomonas aeruginosa* و *intermedium* به ترتیب با توجه به توانایی ایجاد یک منطقه تخریب با قطر ۱۴/۳۳، ۱۴ و ۱۳ میلی متر، قدرت تخریب ۹۳/۳۳، ۹۱/۶۶ و ۸۵ درصدی و نیز OD به ترتیب ۰/۷۵۱۶۷، ۰/۷۵۱۳۳ و ۰/۷۳۶۶۷ در ۶۲۰ نانومتر به عنوان شاخص سرعت رشد در یک بازه زمانی ۱۵ روز بالاترین نرخ تجزیه نفت خام را نشان دادند. در مورد این سه باکتری بین سرعت رشد، قدرت تخریب و قطر منطقه تخریب رابطه مستقیم وجود داشت. این رابطه مستقیم در همه باکتری های مورد مطالعه مشاهده نشد. به عنوان مثال باکتری های *Delftia* و *Kocuria* علی رغم دارا بودن کمترین سرعت رشد در بین ۱۱ باکتری، قدرت تخریب و نیز قطر منطقه تخریب بزرگ تری نسبت به باکتری های دارای سرعت رشد بالاتر نشان دادند و همچنین در مورد باکتری های *Chryseobacterium*، *Cedecea*، *Acintebacter*، *Delftia*، *Bacillus*، *Kocuria*، *Lysobacter*، *Streptomyces* ارتباط چندانی بین سرعت رشد، درصد تخریب و قطر منطقه تخریب وجود نداشت. از یافته های بدست آمده می توان نتیجه گرفت که سرعت رشد بالای یک باکتری تخریبگر نفت خام دلیلی بر قدرت تخریب بیشتر آن در شرایط آزمایشگاهی نیست.

همان طور که مشاهده شد، باکتری های *Ochrobactrum intermedium* و *Planimicrobium chinense*، *Pseudomonas aeruginosa* که دارای نرخ رشد بالاتری نسبت به سایر باکتری ها بودند، میزان تخریب بالاتری هم داشتند. براساس نتایج حاصل از نمودار رشد نسبی، این سه باکتری نسبت به سایر باکتری ها سریعتر به مرحله لگاریتمی رسیده ولی بعد از این مرحله نرخ رشد آن ها کاهش می یابد. این کاهش می تواند به علت افزایش مواد زاید تولید شده توسط باکتری ها و در نتیجه ایجاد شرایط نامساعد برای ادامه رشد و به طبع آن کاهش تخریب نفت خام باشد. از سوی دیگر باکتری های دارای نرخ رشد پایین در مدت زمان طولانی تری به رشد لگاریتمی می رسند و بنابراین نسبت به باکتری های دارای نرخ رشد بالا، مدت زمان بیشتری برای تخریب مواد نفتی در اختیار دارند.

References

- Abed RM, Al-Sabahi J, Al-Maqrashi F et al. (2014) Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm. *J Int Biodeter Biodegr* 89, 58-66.
- Al-Wasify RS, Hamed SR (2014) Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *J Int Bacteriol* 2014, 1-8.
- Bragg JR, Prince RC, Harner E J, Atlas RM (1994) Effectiveness of Bioremediation of Exxon Valdez oil spill. *J Nature* 368, 413-418.
- Hanafy AAEME, Anwar Y, Mohamed SA et al. (2015) Isolation and identification of bacterial consortia responsible for degrading oil spills from the coastal area of Yanbu, Saudi Arabia. *J Biotechnol Biotechnol. Equip* 30, 69-74.
- Malboobi MA, Owlia P, Behbahani M et al (2009) Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *J Microbiol Biotechnol* 25, 1471-1477.
- Margesin R, Labbe D, Schinner F et al. (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *J Appl Environ Microbiol* 69, 3085-3092.
- Riley MA, Chavan MA (2007) *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. J Springer publisher, pp. 19-43.
- Roy A S, Baruah R, Borah M et al. (2014) Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *J Biodeterior Biodegrad.* 94, 79-89.
- Schwab AP, Banks M (1994) Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. *J Abstr Pap Jt Conf - Chem. Inst Can Am Chem Soc* 563, 132-141.
- Subathra MK, Immanuel G, Suresh AH (2013) Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *J Bioinformation* 9, 150-157
- Tanase AM, Ionescu R, Chiciudean I et al. (2013) Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *J Biodeterior Biodegrad* 84, 150-154.
- Udgire M, Shah N, Jadhav M (2015) Enrichment, Isolation and Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria. *J Int of Curr Microbiol Appl Sci* 4, 708-713.
- Varjani SJ, Rana DP, Jain AK et al. (2015) Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *J Int Biodeterior Biodegrad* 103, 116-124.

- Wang J, Wang J, Zhang et al. (2015) Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil-contaminated soil. *J Appl Chem Biotechnol* 91, 2286-2291.
- Weidner S, Arnold W, Puhler A (1996) Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Appl Environ Microbiol* 62, 766-771.
- Winnepenninckx B, Backeljau T, Dewachter R (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *J DHEW Publ (NIH) (U S)* 9: pp. 407.
- Wolicka D, Suszek A, Borkowski A, Bielecka A (2009) Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 100, 3221-3227.
- Xu N, Bao M, Sun P, Li Y (2013) Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 149, 22-30.
- Zhang ZZ, Hou ZW, Yang CY et al. (2011) Degradation of nalkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 102, 4111-4116.

