Archive of SID

محیط شناسی، سال سی و هفتم، شمارهٔ ۵۸ ، تابستان ۹۰، صفحهٔ ۱۴۹-۱۵۸

ارزیابی و مقایسه توانایی باکتری‌های سودوموناس بومی منطقهٔ خورموسی در حذف ترکیبات آروماتیک حلقوی

علیرضا صفاهیه[۱]، فاطمه موجودی*[۲]، حسین ذوالقرنین[۳]

۱- استادیار، گروه بیولوژی دریا و معاونت آموزشی دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر. Safahieh@hotmail.com

۲- کارشناسی ارشد بیولوژی دریا گرایش آلودگی دریا،دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

۳-استادیار. بیوتکنولوژی،گروه بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر zolgharnein@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۹ تاریخ پذیرش:۸۹/۹/۲

چکیده

اغلب هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در محیط دریا پایداری زیادی داشته و در صورت ورود به بدن آبزیان در بافت‌های چربی تجمع می‌یابند. سرطانزایی، جهش‌زایی و ایجاد اختلالات جنینی از جمله آثار سمی این ترکیبات است. از این رو تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفتالن و مقایسهٔ توانایی آنها در حذف این ماده انجام شد. به این منظور پس از نمونه‌برداری از رسوبات آلوده نفتی و انجام مراحل غنی‌سازی باکتری‌های مقاوم به ماده فوق، جداسازی و سپس خالص‌سازی شدند. از ۸ گونه باکتری به دست آمده ۲ گونه که پس از سه روز از تلقیح از جذب نوری بالاتر و pH محیط کشت کمتری برخوردار بودند، به عنوان توانمندترین گونه‌های تجزیه‌کننده برای ادامهٔ آزمایش‌ها برگزیده شدند. با مطالعهٔ ویژگی‌های مورفولوژیکی و انجام یک سری آزمایش‌های بیوشیمیایی مشخص شد که گونه‌های فوق سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا هستند. اندازه‌گیری کاهش میزان سوبسترا به وسیلهٔ دستگاه HPLC نشان داد میزان تجزیه پس از۱۲۰ ساعت برای گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا به ترتیب۰/۶۶۲± ۹۶/۱۴٪ و۱/۱۵۰۱± ۹۱/۴۸٪ بوده است که این مقادیر با مقایسه ۳/۷۳۵±۱۴/۵۹۸٪ تجزیه‌ای که در شرایط مشابه ولی در عدم حضور این باکتری‌ها صورت گرفت نتیجهٔ چشمگیری است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های جدا شده در حذف این آلاینده از محیط‌کشت توانا بوده و بنابراین می‌توان این گونه‌ها را برای انجام آزمایش‌های میدانی پیشنهاد کرده و در شرایط آلودگی بالا، از آنها استفاده کرد.

کلید واژه

خور موسی، پاک‌سازی زیستی، نفتالن، سودوموناس آئروژینوزا ، سودوموناس پوتیدا

سرآغاز

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای گروهی از ترکیبات آروماتیک با حلقه‌های به‌هم پیوستهٔ بنزنی هستند که به‌صورت خطی، زاویه‌دار یا خوشه‌ای به هم متصل شده‌اند. رسوبات و خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی معمولاً شامل مخلوطی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و سایر ترکیبات آروماتیک هستند (Seo, et al.,2009).

این ترکیبات در چربی حل شده و در بافت‌های چربی بدن تجمع می‌یابند (Poeton, et al.,1999) و به علت گسترش محیطی زیاد، سمی‌بودن، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ایجاد اختلالات جنینی از اهمیت خاصی برخوردارند. (Holt, et al., 2005). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی کم، بیش از آن‌که برای انسان مضر باشند برای ماهی‌ها و سایر حیوانات دریایی که در معرض این ترکیبات قرار دارند خطرناک هستند (Sanghvi, 2005). این ترکیبات همچنین بر فعالیت‌های تولید مثلی و توانایی ماهی‌ها در واکنش به استرس اثر منفی دارد. به‌علاوه در بسیاری از موارد، برخی عملکردهای فیزیولوژیکی ماهی مثل متابولیسم انرژی، رشد و سیستم ایمنی را مختل می‌کند (Gesto, et al., 2006).

پاک‌سازی مواد نفتی و سایر منابع‌آلوده کننده دریاها می‌تواند در کاهش آلودگی آب دریا و جلوگیری از نابودی موجودات این اکوسیستم بزرگ مؤثر واقع شود.

برای پاک‌سازی روشهای زیادی وجود دارد که یکی از کم‌هزینه‌ترین و مؤثرترین این روشها استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که قادرند از مواد نفتی به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده

نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۷۵۳۱۳۷۲۸ E-Mail: fatemehmojodi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

کنند و آنها را به مواد بی‌ضرر یا موادی با آلودگی کمتر تبدیل کنند (Vidali, 2001).

پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفتی به‌وسیلهٔ باکتری‌های تجزیه‌کننده از موضوعات حایز اهمیت است که اگرچه مطالعات متعددی را به خود اختصاص داده است لیکن پژوهش کامل در مورد بررسی وجود سویه‌های باکتریایی نفت‌خوار بومی هر منطقه و عملکرد آنها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی از اهمیت بسزایی برخوردار است. تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک در محیط دریا به‌طور طبیعی صورت می‌پذیرد ولی سرعت آن بسیار کند است، از این رو به منظور رسیدن به هدف توسعهٔ پایدار می‌توانیم با استفاده از روشهای بیوتکنولوژی نو، این روش زیستی را تقویت کنیم. به‌طور کلی این‌گونه بررسی‌های آزمایشگاهی به‌دلیل افزایش بازده کار و کاهش هزینه‌های اجرایی برای استفاده از باکتری‌ها در مقیاس صنعتی تعیین‌کننده است.

از این رو هدف از مطالعهٔ حاضر تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفتالن بومی منطقه خور موسی و مقایسه توانایی آنها از نظر پاک‌سازی زیستی است.

مواد وروشها

۳ ایستگاه در منطقهٔ خور موسی بر اساس نزدیک بودن به تأسیسات نفتی و پتروشیمی انتخاب شدند. نمونه‌برداری با ۳ بار تکرار، به‌وسیلهٔ گرب و از سطح رسوبات انجام گرفت. نمونه‌های رسوب در شیشه‌های استریل ریخته شد و پس از قرار گرفتن در محفظه حاوی یخ، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد.

غنی سازی، جداسازی و خالص سازی

ابتدا محیط کشت MSM[1] حاوی املاح معدنی، عناصر کمیاب و نفتالن به عنوان یگانه منبع کربن در تعدادی ارلن تهیه شد. ترکیبات این محیط کشت در جدول شمارهٔ (۱) ذکر شده است (Mukred, et al., 2008).

پس از تهیهٔ رقت‌های متوالی از رسوب و سانتریفیوژ در ۲۰۰۰rpm مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به محیطهای کشت اضافه شد (Coral & Karagöz, 2005). محیطها به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار در دمای $۳۰^{o}C$ و با دور ۱۵۰rpm نگهداری شدند. پس ازگذشت این زمان و با مشاهده کدورت، ۱۰میلی لیتر از آن به محیط کشت جدید انتقال داده شد.

این عمل تا ۳ بار تکرار شد. به این ترتیب جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ نفتالن افزایش پیدا کرد (Nnamchi, et al., 2006).

برای جداسازی گونه های فوق، ۱میلی‌لیتر از محیط حاصل از آخرین مرحلهٔ غنی‌سازی بر روی تعدادی پتری‌دیش حاوی محیط MSM جامد به صورت پورپلیت کشت داده شد. محیطها در دمای $۳۰^{o}C$ در انکوباتور گرماگذاری شدند. پس از رشد باکتری‌ها کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری با هم متفاوت بودند با انجام چندین کشت متوالی خالص‌سازی شدند.

جدول شمارهٔ (۱): ترکیبات محیط کشت MSM

ترکیبات	مقدار
KH2PO4	۲gr
NH4NO3	۰/۱gr
MgSO4	۰/۱gr
NaCL	۰/۱gr
FeSO4.7H2O	۰/۱gr
Na2HPO4	۲/۴gr
CaCl2.2H2O	۰/۰۱۳gr
ZnSO4.7H2O	۱/۴gr
MnSO4.7H2O	۱/۲gr
CuSO4.5H2O	۰/۲۵gr
آب مقطر	۱۰۰۰ml

انتخاب توانمندترین گونه‌ها در تجزیهٔ نفتالن

برای انتخاب بهترین نمونه در تجزیهٔ نفتالن، کدورت سنجی در ۶۰۰nm و اندازه‌گیری pH محیط کشت پس از ۳ روز از تلقیح باکتری‌ها انجام گرفت. باکتری‌هایی که از رشد بیشتر و نیز توان بهتری در تجزیهٔ نفتالن برخوردار بودند، جذب نوری بالاتر و pH محیط کشت کمتری داشتند، از این رو برای ادامهٔ آزمایش‌ها انتخاب شدند (Nnamchi, et al., 2006).

شناسایی باکتری

اولین مشخصهٔ شناسایی، مرفولوژی باکتری‌هاست. به این دلیل خصوصیات ظاهری باکتری‌ها به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن برای شناسایی دقیق‌تر باکتری‌ها از تست‌های معمول بیوشیمیایی و کتاب راهنمای نظام‌مندی برجی استفاده شد.

بازدهٔ تجزیهٔ نفتالن به‌وسیلهٔ گونه‌های منتخب

محیط MSM با غلظت ۶۰ppm نفتالن تهیه وتلقیح باکتریایی در آن صورت گرفت. برای هر باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به این که نفتالن ماده‌ای فرار است سه نمونه شاهد نیز بدون تلقیح باکتری با همان غلظت در نظر گرفته شد تا اثر سایر عوامل از حذف زیستی نفتالن متمایز شود. برای بررسی کاهش نفتالن در محیط کشت ابتدا می‌باید نفتالن موجود در محیط کشت از فاز آبی جدا و وارد فاز آلی شود. به این منظور در فواصل زمانی معین ۵ میلی لیتر از هر محیط کشت به همراه ۲ میلی لیتر هگزان به عنوان حلال به لوله‌های آزمایش منتقل و بخوبی هم زده شد و پس از برداشت مایع رویی و تبخیر حلال، ۵ میلی لیتر استونیتریل به آن اضافه شد (Coral and Karagöz, 2005). برای اندازه‌گیری میزان نفتالن از دستگاه HPLC KNAUER استفاده شد. حلال‌های دستگاه آب و استونیتریل به نسبت ۳۰ به ۷۰ با شدت جریان ۱ ml/min بود.

برای استفاده از دستگاه ابتدا چند محلول با غلظت‌های معین نفتالن در استونیتریل تهیه و به دستگاه تزریق شد تا هم زمان بازیابی نفتالن به دست آید و همچنین با داشتن غلظت مشخصی سطح زیر پیک منحنی استاندارد نفتالن مشخص شود. نمونه‌های حاصل از مرحلهٔ استخراج با سرنگ به دستگاه تزریق شدند. نرم‌افزار دستگاه غلظت مادهٔ مجهول را بر مبنای نسبت مساحت‌ها محاسبه کرد (kang, et al., 2007).

از نرم‌افزار Excel برای رسم کردارها و نرم‌افزار spss برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. از تجزیه‌وتحلیل واریانس یک‌طرفه[۲] برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین غلظت نفتالن ارلن‌های حاوی باکتری و بدون باکتری استفاده شد.

نتایج

با انجام آمایش‌ها معمول میکروبیولوژی مجموعاً ۸ باکتری جداسازی و خالص‌سازی شد. مطابق جدول شمارهٔ (۲) این باکتری‌ها MB10 تا MB80 نام‌گذاری شدند. اکثر ایزوله‌ها جزء باکتری‌های گرم منفی، غیرتخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت (سودوموناس) بودند.

در مرحلهٔ بعدی بر اساس میزان کدورت حاصل از رشد آنها در محیط MSM و کاهش pH محیط کشت‌ها طی مدت ۳ روز باکتری‌های MB30 و MB10 به ترتیب به عنوان توانمندترین باکتری‌ها در تجزیهٔ نفتالن، برای ادامهٔ مطالعات انتخاب شدند.

رشد باکتری در محیط مایع با کدر شدن محیط مشخص می‌شود، همچنین ایجاد متابولیت‌های اسیدی حاصل از تجزیهٔ نفتالن به‌وسیلهٔ گونه‌های باکتریایی، باعث افت محسوس PH محیط کشت‌ها شد.

نتایج بررسی‌ها و تست‌های بیوشیمیایی دو گونه فوق در جدول شمارهٔ (۳) ارایه شده است.

جدول شمارهٔ (۲): باکتری‌های ایزوله شده از مرحلهٔ جداسازی

ایزوله	نام باکتری
MB10	سودوموناس
MB20	آلکالیجنز
MB30	سودوموناس
MB40	سودوموناس
MB50	باسیلوس
MB60	سودوموناس
MB70	میکروکوکوس
MB80	سودوموناس

جدول شمارهٔ (۳): مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ۲ گونه باکتری منتخب

تست یا بررسی	MB30	MB10
رنگ آمیزی گرم	−	−
تست KOH	+	+
سلول	میله ای	میله ای
خصوصیات ظاهری کلنی	گرد، مسطح با بوی شیرین و سایز متوسط	گرد، شفاف و صیقلی
رنگ کلنی	سبز آبی	کرمی
کاتالاز	+	+
اکسیداز	+	+
حرکت	متحرک	متحرک
احیای نیترات	+	−
تولید H_2S	−	+
TSI	K/K	K/K
اوره	−	−
سیمون سیترات	+	+
تولید اندول	−	−
متیل رد	−	+
VP	−	−
ژلاتین	+	−
فنیل آلانین	+	−
اکسیداسون وتخمیر	اکسید کننده	اکسیدکننده
لایزین	−	−
رشد روی محیط مک کانکی	+	+

با استفاده از نتایج به دست آمده و با کمک کتاب راهنمای برجی مشخص شد که گونه MB10 و MB30 به ترتیب شباهت

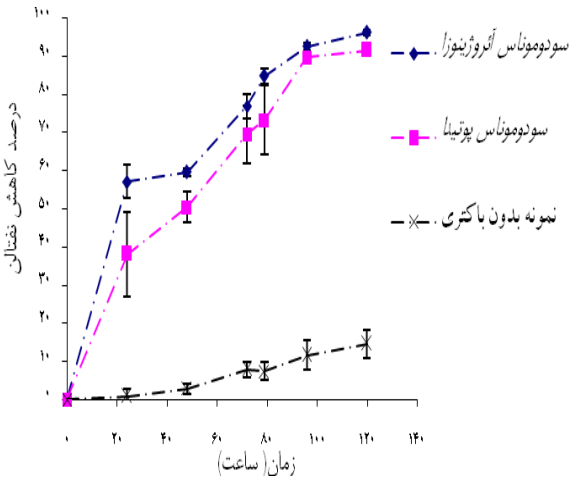
www.SID.ir

Archive of SID

زیادی به گونه‌های سودوموناس پوتیدا (*P.putida*) و سودوموناس آئروژینوزا(*P. aeroginosa*) دارند.

نتایج آزمایش ها کاهش بیولوژیکی نفتالن در محیط مایع MSM، توسط دو باکتری منتخب در شکل شمارهٔ (۲) ذکر شده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود بیشترین درصد حذف نفتالن از محیط کشت، مربوط به ساعات اولیه پس از تلقیح است و پس از آن کاهش نفتالن از محیط روند تقریباً ثابتی به خود گرفت. همچنین کاهش چشمگیری در سطح نفتالن موجود در محیط کشت بدون باکتری (نمونه شاهد)، مشاهده نشد، به طوری که پس از ۱۲۰ ساعت، یگانه ۳/۷۳۵±۱۴/۵۹۸ از نفتالن محیط کشت حذف شد.

از این رو می‌توان نتیجه گرفت که عوامل غیرزیستی تأثیر چندانی درحذف نفتالن ندارند. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری ANOVA یکطرفه، بین تیمارهای هر دو باکتری با تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) از نظر میزان نفتالن باقیمانده در سطح خطای ۰/۰۵ و تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو گونهٔ منتخب تفاوت معنی‌داری از نظر کاهش نفتالن مشاهده نشد.

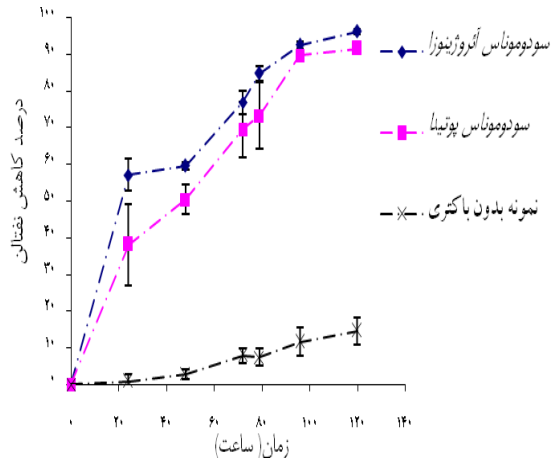


شکل شمارهٔ (۲): کاهش نفتالن توسط دو گونهٔ جدا شده

بحث و نتیجه‌گیری

طی مطالعات بسیاری که در گذشته انجام شده، تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌ها در رسوبات دریایی به اثبات رسیده است.

Dann و همکاران (۲۰۰۲) باکتری‌های جنس پائنی‌باسیلوس را از رسوبات آلوده به هیدرو کربن‌های نفتی جداسازی کردند.



شکل شمارهٔ (۳): درصد کاهش نفتالن در ارلن‌های حاوی باکتری و ارلن های بدون باکتری

در این آزمایش‌ها از نفتالن و فنانترن به عنوان منبع کربن استفاده شد. Khalid و همکارانش (۲۰۰۴) نیز برای ارزیابی تجزیهٔ زیستی ۳ ترکیب از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (فنانترن، پایرن وفلورانتن)، گونه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده را از رسوبات ۳ ایستگاه آلوده نفتی دریای اگزایمن وسترن، جداسازی کردند.

گونه‌های فوق متعلق به جنس‌های آئروباکتریوم، رودوکوکوس و آرتروباکتر بودند. این گونه‌ها از توانایی بالایی در تجزیه ترکیبات مذکور داشتند. Taoufik و همکاران (۲۰۰۴) گونه‌های کلبسیلا پنئومونیا، پروتئوس میرابیلیس و نیز دو گونه سودوموناس و استافیلوکوکوس را از رودخانه‌ای آلوده به ترکیبات هیدروکربنی در مورکو، جداسازی و خالص‌سازی کردند. Kayode و همکاران (۲۰۰۸) ۱۲ گونه باکتری را که قادر به رشد بر نفت دیزل بودند و توانایی تجزیه آن را به عنوان یگانه منبع کربنی داشتند، از آب و رسوبات آلوده نفتی رودخانه‌ای در ابرک چین، جداسازی کردند.

در ایران نیز زهرا یعقوب‌زاده و همکاران(۱۳۸۵) باکتری های جنس باسیلوس (*Bacillus sp.*) و سودوموناس (*Pseuomonas sp.*) و ویبریو (*Vibrio sp.*) را به عنوان گونه‌های شاخص در تجزیهٔ نفتالن نمونه‌های آب دریای خزر (بنادر نوشهر و امیر آباد) جداسازی کردند. نتایج مطالعات گویای آن است که جوامع میکربی تجزیه‌کننده در مناطق آلوده، توسعهٔ بیشتری نسبت به مناطق غیرآلوده دارند (Geiselbrecht, et al., 1996).

در این ارتباط کارگر و همکاران (۱۳۸۵)، طی آزمایش‌هایی که بر باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت‌ها و کاربرد آنها در حذف

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروکربن‌های نفتی انجام دادند، نتیجه گرفتند که تعداد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده در نمونه‌های آب آلوده ارتباط زیادی با درجهٔ آلودگی نفتی دارد.

از این رو در مطالعه حاضر از رسوبات آلوده‌ای که به مدت طولانی در معرض هیدروکربن‌های نفتی قرار داشتند نمونه‌برداری شد، چون احتمال وجود باکتری‌های تجزیه‌کننده در آن مناطق بیشتر بود. در این میان اکثر ایزوله‌ها در این پژوهش، از باکتری‌های گرم منفی از جنس سودوموناس (باکتری‌های میله‌ای، غیرتخمیری، اکسیداز و کاتالاز مثبت) و یک گونه هم از جنس آلکالیجنز بود. این گونه‌ها توانایی استفاده از نفتالن را به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی دارا بودند.

توانایی این گونه‌ها را در تجزیهٔ زیستی آلاینده‌ها به دفعات توسط محققان مختلف گزارش کرده‌اند و بسیاری از مطالعات قبلی منجر به جداسازی گونه‌های فوق از محیط‌های آبی و خاکی شده است. در تمامی‌این موارد توانایی آنها در استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی تأیید شده است و امروزه بیشتر از آنها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود (Chakrabarty, 1972 & Chakrabarty, et al., 1973). بخصوص جنس سودوموناس که از باکتری‌های همه جا حاضر است که به باکتری‌های زیر ردهٔ گاما از پروتوباکترها تعلق دارند، این باکتری‌ها نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های متابولیکی محیط زیست، مانند چرخهٔ عناصر و تجزیهٔ آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیرزیستی را بازی می‌کنند. توانایی سودوموناس‌ها در زمینهٔ عملیات و فعالیت‌های بیوتکنولوژی بویژه در زمینهٔ تجزیهٔ زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Nelson, et al., 2002).

مشخص شده که باکتری‌های جنس سودوموناس، توانایی بسیار بالایی در استفاده از ترکیبات آروماتیک دارند. از این رو این باکتری‌ها، به دفعات از انواع اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات نفتی جدا شده‌اند و علاوه بر نفتالن توانایی تجزیه ترکیبات پلی‌آروماتیک با تعداد حلقه‌های بیشتر را نیز دارا هستند (Nnamchi, et al., 2006). این باکتری‌ها در حضور اکسیژن (به عنوان پذیرنده الکترونی) و از راههای بیوشیمیایی تجزیهٔ هوازی، مواد آلی را تجزیه می‌کنند.

چرخهٔ تنفسی این باکتری‌ها شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است (Minui, 2008). جنس سودوموناس از معمول باکتری‌هایی است که در اغلب گزارش‌های مربوط به تجزیهٔ زیستی وجود دارد (Minui, et al, 2009 & Tekorienė, 2008 & Taoufik, et al., 2004 & Guieysse, et al., 2004 & Ilori and Amund, 2000 &Hedlund, et al., 1999 & Magdalena, et al., 1995).

در واقع گونه‌های بسیاری در تجزیهٔ ترکیبات نفتی جداسازی شده‌اند، ولی گونه‌های سودوموناس به عنوان توانمندترین گونه‌های برجسته و شاخص شناخته شده‌اند و حضور آنها در اغلب شرایط محیطی، عامل مهمی است که استفاده از آنها را در اغلب محیط‌ها ممکن می‌سازد (Okoh, 2003). نتایج مطالعات تجزیهٔ زیستی و کاهش نفتالن در محیط‌کشت پایه معدنی حاوی باکتری‌های فوق گویای کاهش چشمگیر نفتالن بود. به طوری که پس از ۱۲۰ ساعت از تلقیح باکتری‌ها ۹۶/۱۴۷±۰/۶۶۳، ۹۱/۴۸۵ ±۱/۵۰۲ درصدکاهش در میزان نفتالین اولیه به ترتیب درمحیط کشت‌های حاوی سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس پوتیدا اتفاق افتاد.

اهمیت نتایج این تحقیق زمانی آشکار می‌شود که بدانیم نیمهٔ عمر تجزیهٔ زیستی کامل نفتالن ماهها به طول می‌انجامد (Nnamchi, et al., 2006).

نتایج حاکی از آن است که بیشترین میزان تجزیه‌کنندگی، به‌وسیلهٔ گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا پس از گذشت ۲۴ ساعت از حضور باکتری در محیط‌کشت رخ می‌دهد، به طوری که در این مدت، گونه سودوموناس پوتیدا ۱۱/۰۹۵±۳۸/۰۳۸ درصد وگونه سودوموناس آئروژینوزا ۴/۳۲±۵۷/۰۹۹ درصد، از نفتالن موجود در محیط‌کشت را تجزیه کردند.

همان طور که ملاحظه می‌شود، گونه سودوموناس آئروژینوزا در همان ۲۴ ساعت ابتدایی انکوباسیون، بیش از نیمی از نفتالن را مورد تجزیه قرار داده است. با توجه به کردارهای اشکال۳-۸ و ۳-۹، این میزان تجزیه نفتالن، تنها در این زمان(۲۴ ساعت اول) دیده می‌شود و با گذشت زمان، از میزان درصدکاهش سوبسترا کم می‌شود.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سرعت تجزیهٔ آلاینده با غلظت آن رابطهٔ مستقیم داشته و با کم شدن غلظت آلاینده، زیست دسترس‌پذیری آن کاهش یافته و عمل تجزیه کندتر صورت می‌گیرد. محققان دیگر نیز عملکرد باکتری‌های جدا شده بر تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را مورد بررسی قرار داده‌اند از جمله Abou Seoud و Maachi (۲۰۰۳)، که میزان تجزیه نفتالن توسط

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌ای سودوموناس جدا شده از فاضلاب آلوده یک پالایشگاه نفت را اندازه‌گیری کرد.

باکتری فوق، در چهار روز پس از انکوباسیون غلظت ۲۵ میلی‌مول نفتالن را به طور کامل تجزیه کرد، ولی فقط ۶۰٪ از غلظت‌های بالاتر را مورد تجزیه قرار داد. Kucerova (۲۰۰۶)، نیز با نمونه‌برداری از نمونه‌های خاک آلوده به ترکیبات پلی‌آروماتیک گونه سودوموناس پوتیدا را جدا سازی کرد و با انجام آزمایش‌ها تجزیهٔ زیستی متوجه شد که این باکتری پس از یک ماه انکواسیون ۸۱٪ از این ترکیبات را از محیط کشت حذف می‌کند.

در مطالعه‌ای که توسط Kumar و همکارانش (۲۰۰۶)، انجام دادند، گونه‌های سودوموناس پوتیدا سویه *5a1* و سودوموناس آئروژینوزا سویه *DHT-GL* را از نمونه‌های خاک آلوده نفتی از منطقه گوانکو آسفالت بلت در ونزوئلا جداسازی کردند.

توانایی این گونه‌ها در تجزیهٔ نفت، نفتالن و چند هیدروکربن نفتی دیگر مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها تجزیه نفت در محیط‌کشت پایه معدنی مایع حاوی نفت تلقیح شده با سودوموناس پوتیدا و سودوموناس آئروژینوزا و مخلوط دو باکتری، پس از ۲۰ روز از شروع گرماگذاری باکتری‌ها، به ترتیب ۴۴٪ ، ۲۴٪ و ۹۲٪ بود در حالی‌که در خاک آلوده به ترتیب ۳۸٪، ۲۰٪ و۸۰٪ بود. قدرت تجزیه کنندگی این دو سویه به دلیل تولید بیوسورفاکتانت‌هایی بیان شد، که باعث افزایش امولسیونه شدن هیدروکربن‌های نفتی و همچنین تغییر در جاذبه سطحی و اتصال هیدروکربن به سطح سلول باکتری‌ها می‌شود.

همچنین طی مطالعه دیگر این محققان (۲۰۰۶)، باکتری *IR1* را با توانایی تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای و تولید بیوسورفاکتانت، از مناطق آلودهٔ نفتی در کاراکاس ونزوئلا جداسازی کردند. این ایزوله توسط توالی ۱۶srRNA سودوموناس پوتیدا شناسایی شدکه توانایی تجزیهٔ ترکیبات ۲، ۳ و ۴ حلقه‌ای را دارا بود.

بعد از یک هفته از شروع انکوباسیون این باکتری٪(۳±۶۹)،٪(۲±۷۲)، ٪(۴±۸۲) و٪(۴±۶۰)، به ترتیب پایرن، نفتالن، DBT و فنانترن را مورد تجزیه قرار داد. Olo-Artiova و همکارانش (۲۰۰۷)، گونه سودوموناس آئروژینوزا را از آب‌های آلوده پالایشگاهی جداسازی کرد. این باکتری غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر نفت در ۷ میلی‌لیتر محیط‌کشت پایه معدنی را در طول ۲۰ روز به ۰/۷ میلی‌لیتر کاهش داد.

Mukred و همکاران (۲۰۰۸)، هم ۴ گونه باکتریایی را از فاضلاب پالایشگاه نفت ترنگانو بر اساس توانایی در رشد و تجزیه، برای آزمایش‌ها تجزیه زیستی جدا کردند. سودوموناس پوتیدا یکی از این ایزوله‌ها بود که ۹۶٪ از هیدروکربن موجود در محیط کشت را مورد تجزیه قرار داد.

Mittal و Singh (۲۰۰۹)، ۲۰ گونه تجزیه‌کننده نفت را از خاکهای آلودهٔ مناطق نفتی لینگالا و توقفگاه هاردوار، جداسازی کردند که ۲۷ درصد ایزوله‌ها از جنس سودوموناس شناسایی شدند.

در مقایسه با سایر ایزوله‌ها، سویه سودوموناس ps-1، تواناترین باکتری در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی شناخته شد. این باکتری ۵۷/۱۳٪ نفت را طی مدت ۶۰ روز مورد تجزیه قرار داد. همان طورکه ملاحظه می‌شود، نتایج حاصل از این تحقیق گویای آن است که باکتری‌های ایزوله شده، دارای نتایج برابر و حتی بهتر از گونه‌های مشابه به دست آمده در تحقیقات ذکر شده توسط سایر محققان است.

همان طور که در اشکال شمارهٔ (۳تا ۱۲) مشاهده می‌شود، توانایی ایزوله‌های منتخب در تجزیهٔ نفتالن، اندکی با هم متفاوت است. به طوری که کاهش زیستی نفتالن پس از ۱۲۰ ساعت از تلقیح باکتری‌ها، توسط سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از دو باکتری دیگر است. در محیط کشت حاوی باکتری سودوموناس‌آئروژینوزا بیشترین میزان و درصد حذف در تمامی‌ساعات، دیده می‌شود.

توانایی سودوموناس آئروژینوزا را در تجزیهٔ ترکیبات نفتی از جمله نفتالن، بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند. نتایج کار Thavasi و همکاران (۲۰۰۷)، در جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌های نفتی از مناطق آلوده محیط‌های دریایی نشان داد که باکتری سودوموناس آئروژینوزا با ۸۵/۱۵ ٪ تجزیه نفت، بهترین توانایی را در حذف این ترکیبات داراست. ادامهٔ آزمایش‌ها، فعالیت خوب امولسیون‌سازی این گونه را در مجاورت نفتالن، آنتراسن، روغن روان‌کنندهٔ موتور، نفت خام، رنگ‌های روغنی، نفت سفید و گزیلن نشان داد.

نتایج گویای آن بود که گونه سودوموناس آئروژینوزا، گونه‌ای توانا در تجزیه و امولسیون‌سازی نفت خام و انواعی از هیدروکربن‌هاست.

Das و Mukherjee (۲۰۰۷)، نیز دو گونه سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس را از خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی جدا کردند و توانایی آنها را برای مقایسهٔ تجزیهٔ زیستی

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروکربن‌های نفت خام در خاک و فلاسک‌های دوار مورد بررسی قرار دادند. این باکتری‌ها توانایی استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یگانه منبع کربن و انرژی را دارا بودند. تلقیح زیستی میکروکوسم آلوده به TPH با این دو گونه، کاهش شدید آلاینده‌ها را نشان داد ولی گونهٔ سودوموناس آئروژینوزا به گونه‌ای تواناتر عمل کرد. نتایج حاکی از آن بود که این باکتری‌ها برای تجزیهٔ زیستی درجا بسیار مناسب هستند.

به طور کلی بین سه باکتری انتخاب شده برای آزمایش‌های تجزیهٔ زیستی، رفتار گونه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی نفتالن تقریباً با هم مشابه است. پس این طور می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های مذکور از نظر ژنتیکی به یکدیگر نزدیک بوده و دارای صفات ژنتیکی مشابهی هستند. این توانایی باکتری‌های جنس سودوموناس به دلیل وجود تنوع و نیز تولید تعداد زیادی آنزیم‌های مورد نیاز کاتابولیکی و از آن مهم‌تر به دلیل توانایی ذاتی بسیار خوب آنها در سازگاری با شرایط مختلف محیطی است.

این اعتقاد وجود داردکه توانایی سازشی بالای جنس سودوموناس به دلیل خصوصیات ذاتی آنهاست که به آنها اجازه القاء تصادفی آنزیم‌های مورد نیاز تجریه، از راههای مختلف کاتابولیکی می‌دهد موجب به دست آوردن خصوصیات جدید برای تجزیه زیستی می‌شود (Okoh, 2003).

طبق یافته‌های Okoh (۲۰۰۳)، نیز از بین ۴ سویهٔ باکتری سودوموناس آئروژینوز (OK1، MT1، RQ1 وT2) تجزیه‌کنندهٔ نفت OK1، MT1 وT2 ، نرخ تجزیه نسبتاً یکسانی را در تجزیهٔ ترکیبات نفتی نشان دادند که علت، تشابه ژنتیکی این ایزوله‌ها با یکدیگر، در تجزیه زیستی نفت گزارش شد.

Oboh و همکارانش (۲۰۰۶) هم در تلاشی برای جداسازی گونه‌های میکربی فعال در ارتباط با تجزیهٔ زیستی هیدروکربن‌های نفتی از رسوبات آلوده نفتی در نیجریه توانایی سه گونه (سودوموناس ستاتزری، سودوموناس مولی و آلکالیجنز) در تجزیهٔ زیستی نفتالن، کروزن و نفت دیزل را مورد مطالعه قراردادند.

در نتایج حاصل تفاوت معنی‌دار آماری ($p>0/05$) در نرخ تجزیه و مصرف هیدروکربن‌ها دیده نشد (بخصوص در رابطه با گونه‌های سودوموناس)، از این رو طبق گزارش این محققان گونه‌های فوق در توانایی تجزیهٔ این هیدروکربن‌ها، از نظر ژنتیکی با هم شباهت دارند. با توجه به اشکال شمارهٔ (۲و۳)، در مقایسهٔ با کاهش نفتالن در محیط کشت‌های تلقیح شده با باکتری، افت نفتالن در محیط کشت بدون باکتری ناچیز است همچنین آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که بین کاهش نفتالن در ارلن حاوی باکتری و ارلن فاقد باکتری در سطح خطای کمتر از ۰/۰۱تفاوت قوی و معنی‌داری وجود دارد. این کاهش جزئی در غلظت اولیه نفتالن، نشان‌دهنده آن است که عوامل غیربیولوژیکی تأثیر چندانی در حذف نفتالن نداشته‌اند.

این مقدار اندک کاهش، نیز احتمالاً ناشی از تبخیر یا ماندن نفتالن در جداره‌های ظرف است. البته احتمال حذف ناشی از فتواکسیداسیون، بسیار کم است، زیرا ارلن‌ها در شرایط تاریکی کامل، انکوبه می‌شدند. این مقایسه، نشان می‌دهدکه باکتری‌ها، در حذف این آلاینده از محیط‌کشت توانا بوده و در محیط طبیعی، نیز احتمالاً رفتاری مشابه خواهند داشت.

از این رو برای مقاصد پاک‌سازی محیط زیست به‌خصوص در منطقه خور موسی، مناسب به نظر می‌رسند و از آن جا که در عصرحاضر، رویکرد جدید به محیط زیست و در نظر گرفتن آن به عنوان یک جزء از سرمایهٔ ملی کشورها و در نتیجه، لزوم حفظ آن با استفاده از زیست فناوری از مهم‌ترین دغدغه‌های بشر است، حذف مؤثر آلاینده‌های محیطی خطرناک از محیط زیست، با استفاده از این باکتری‌های پالایشگر آلودگی، بسیار مورد توجه است.

در واقع کاربرد زیست فناوری در پاک‌سازی مکان‌های آلوده که منجر به حذف آلاینده‌ها با صرف هزینه و انرژی کمتر و از همه مهم‌تر با کمترین اثر مخرب بر محیط زیست می‌شود، باعث شده که از این فناوری به عنوان یکی از پاک‌ترین و در عین حال سودآورترین بخش‌های صنعت یاد شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله لازم می‌دانیم ازآقایان عبداله پور و لفته پور به دلیل همکاری در نمونه‌برداری و تمام کارکنان آزمایشگاههای معتمد، شیمی و میکروبیولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر که در تمام مراحل اجرای این پروژه با ما همکاری داشتند قدردانی و تشکر کنیم.

یادداشت‌ها

1-Mineral Salt Medium

2-One way ANOVA

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

کارگر، م.، ف. کفیل‌زاده، ن. گودرزیان، ا. نوحی. ۱۳۸۵. شناسایی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت و کاربرد آنها در حذف آلاینده‌های نفتی، علوم و تکنولوژی محیط زیست، شمارهٔ ۲۹، صص ۱۰۹-۱۱۸.

یعقوب زاده، ز. ۱۳۸۵. تجزیهٔ بیولوژیکی نفتالن با استفاده از باکتری‌های جدا شده از آب دریای خزر، مجلهٔ علوم دریایی ایران، دورهٔ پنجم، شمارهٔ ۲، صص ۶۸ تا ۷۵

Abou Seoud,M. and R.,Maac. 2003. Biodegredation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas sp.,* Z. Naturforsch. 58c: 726-731.

Chakrabarty,A.M. 1972. Genetic basis of the bioremediation of salicylate in *Pseudomonas*. j. Bacterial. 112:815-823.

Chakrabarty,A.M., G.,Chou, and I.C.,Gumsalus .1973. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas* . Proc. Natl .Acad . Sci . U.S.A .1973. Vol: 1137-1140

Coral,G. and S.,Karagöz .2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery. Soil. Ann. Microbiol. 55(4): 255-259.

Daane,L.L., et al. 2002. PAH-degradation by paenibacillus sp. and description of *paenibacillus naphthalenovorans*, sp. nov. , a naphthalene – degrading bacterium from the rhizospher of salt marsh plants . Int. J. . Syst. Evol. Microbiol. 52 : 131 -139.

Das,k., and K.,Mukherjee. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation eyciency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technol. 98: 1339-1345.

Garrity,G.M. 2005. In Brenner, D.J. krig, N.R. Staley J.T.(ed). Bergey's manual of systematic bacteriology.2nd ed. Springer, New York. 2c:323-384.

Geiselbrecht,A.D., et al. 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3344–3349.

Gesto,M., et al .2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp. Biochem. Physiol. 144: 173–183.

Guieysse,B., et al. 2004. Combined UV-biological degradation of PAHs. Chemosphere. 55: 1493–1499

Holt,J., et al. 2005. Bioremediation and Biodegradation 9,10-Phenanthrenequinone Photoautocatalyzes its Formation from Phenanthrene, and Inhibits Biodegradation of Naphthalene. J. Environ. Qual. 34:462–468.

Ilori,M.O.N., and D.I.,Amund. 2000.Degradation of Anthracene by Bacteria Isolated from Oil Polluted Tropical Soils. Z. Naturforsch. 55c: 890-897.

Kang,Y., et al .2007. Over expressing antioxidant enzymes enhances naphthalene biodegradation in *Pseudomonas sp. strain As1*. Microbiol. 153: 3246–3254.

www.SID.ir

Archive of SID

Kayode,T.M., et al. 2008. Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. Am-Euras. J. Agron. 1 (1): 06-09.

Khalid,M., et al. 2004. Preliminary study on PAH degradation by bacteria from contaminated sediments in Xiamen Western Sea, Fujian, China. Chin. J. Oceanol. Limnol. 22(4): 431 -435.

Kumar,M.,et al. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas sp. IR1*. Z. Naturforsch. 61c: 203- 212.

Kucerova,R. 2006. Application of *pseudomonas putida* and *rhodococcus sp.* By biodegradation of PAH(s), PCB(s) and nel soil samples from the hazardous waste dump in pozďátky (czech republic). Rud. Geol. Naft. 18:97-101.

Magdalena,G., et al. 1995. Action of a versatile flurene degrading bacteria isolation on poly aromatic compounds. Appl. Environ. Microbial. 61(10):3711-3723.

Minoui,S., et al. 2009. Change in cytochromes contetn of *pseudomonas sp* in the medium contaning petroleum. Aust. J. Basic; Appl. Sci. 3(3): 1512-1516.

Minoui,S., et al. 2008. Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas sp.* Terr. Aquat. Envinronm. Toxicol. 2(1): 34-37.

Mittal,A. and p.,Singh. 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crud oil spills. Indian J. Exp. Biol. 47: 760 -765.

Mukred,A.M., et al. 2008. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. OnLine J. Biol. Sci. 8 (4): 73-79.

Nelson,K.E., et al. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas Putida KT2440*. Environ. Microbiol. 4(12):799–808.

Nnamchi,C.I., J.A.N.,Obeta, L.I.,Ezeogu. 2006. Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int. J. Environ. Sci. Tech. 3(2): 181-190.

Oboh, B.O., et al .2006. Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit .Nat. Sci. 4(3): 51-57.

Okoh, A.I. 2003. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 2(5): 104-108.

Olo-Artiova,O.A., M.O.,Aremu, A.O.,Alade .2007. Ex-situ bioremediation of diesel polluted wastewater in tropical hot climate. Asian J. of Inform. Tech. 6(9): 961-963.

Sanghvi,S. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination using *Mycobacterium vanbaalenii*. Biothechnol. J. 1: 654-661.

Seo,J.S., Y.S.,Keum, and Q.X.,Li. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. J. Environ. Res. Public Health. 6: 278- 309.

www.SID.ir

Archive of SID

Poeton,T.S., H.D.,Stensel, and S.E.,Strand. 1999. Biodegradation of poly aromatic hydrocarbons by marine bacteria: effect of solid phase on degradation kinetics. Elsevier Science Ltd. 33(3): 868-880.

Taoufik,J., et al. 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp., Staphylococcus sp.)* in fluidized bed bioreactor. Ann. Microbiol. 54 (2): 189-200.

Tekorienė,R. 2008. Distribution of the genus *Pseudomonas* bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products. Ekol. 54(3): 143–148.

Thavasi,R., et al. 2007. Plasmid incidence in four species of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from oil polluted marine environment. Biotechnol. 6(3): 349-352.

Vidali,M. 2001. Bioremediation.An overview. Pure Appl. Chem. 73, 1163–1172

www.SID.ir