Archive of SID

مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۶۸-۱۵۶

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو در کرمانشاه

نرگس شمسی[۱]، رؤیا مروج[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، [۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج.

چکیده

سابقه و هدف: اصلاح زیستی یکی از روش های پاکسازی آلودگی های نفتی است که به دلیل مزایایی مانند هزینه اندک، کارایی بالا و سازگاری با محیط زیست، در سال های اخیر بسیار مورد توجه بوده است. رودخانه قره سو نیز یکی از مناطقی است که به دلیل مجاورت با پالایشگاه نفت کرمانشاه، در سال های اخیر دچار آلودگی نفتی شده است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو در کرمانشاه انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت تجربی بر روی نمونه های آب، خاک و لجن فعال مناطق آلوده انجام شد. دو جدایه تجزیه کننده تولوئن با استفاده از غنی سازی بر روی محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن به دست آمدند. این جدایه ها با روش های ریخت شناسی کلنی، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی و توالی یابی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. همچنین میزان حذف تولوئن توسط جدایه ها با روش کروماتوگرافی گازی ارزیابی گردید.

یافته ها: هر دو جدایه متعلق به گونه باکتریایی *سودوموناس پوتیدا* بودند. با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی ثابت شد که جدایه ها توانستند تولوئن موجود در محیط کشت (با غلظت ۰/۵ v/v درصد) را در مدت ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۸۹٪ و ۸۷٪ تجزیه نمایند. همچنین این جدایه ها قادر بودند شرایط نامساعد دمایی، pH و اسمولاریته را تحمل نمایند. همچنین اثبات گردید که این جدایه ها قادرند در حضور دیگر آلاینده های نفتی (بنزن، اتیل بنزن، زایلن) نیز به طور کارآمد به فعالیت و رشد خود ادامه دهند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که این جدایه ها به دلیل توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه طیف وسیعی از آلاینده ها می توانند کارآیی بالایی برای حذف آلاینده های نفتی از محیط زیست داشته باشند.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، تولوئن، پساب پالایشگاه نفت، رودخانه قره سو، *سودوموناس پوتیدا*.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۵

مقدمه

یکی از مهمترین انواع آلودگی های تهدید کننده محیط زیست، آلودگی های نفتی هستند. آلودگی نفتی عبارت است از وارد شدن هیدروکربن های نفتی به محیط زیست (به ویژه نواحی دریایی مانند اقیانوس ها و آب های ساحلی) در اثر فعالیت های انسانی. ورود این آلودگی ها می تواند در اثر نشت نفت خام یا فراورده های آن از طریق تانکرها، سکوهای نفتی، پالایشگاه ها، کشتی های نفت کش یا مراحل حفاری باشد که معمولاً نتیجه سوء مدیریت و یا حوادث پیش بینی نشده هستند. آلودگی های نفتی اثرات اقتصادی و زیست محیطی زیان باری دارند و حذف آن ها بسیار دشوار است (۱).

سالیانه در جهان حدود ۵ میلیون تن نفت خام و فراورده های آن به صورت آلودگی نفتی وارد محیط زیست می شود (۲).

*) آدرس برای مکاتبه: کردستان، سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۸۳۷۱۸۴۷۴ پست الکترونیک: roya.sanandaj@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

این آلودگی ها آسیب های غیرقابل جبرانی به زیست بوم های طبیعی، سلامت جوامع انسانی و چرخه اقتصاد وارد می کنند.

از این رو، در هنگام وقوع آلودگی نفتی در یک ناحیه باید هرچه سریعتر برای پاکسازی و حذف آلودگی اقدام شود. اصلاح زیستی یکی از روش های پاکسازی آلودگی نفتی است که مزایای متعددی نسبت به سایر روش های پاکسازی دارد. استفاده از اصلاح زیستی نسبتاً ارزان است. به طور مثال، در طول پاکسازی آلودگی اگزون والدز که در سواحل آلاسکا اتفاق افتاد، هزینه اصلاح زیستی ۱۲۰ کیلومتر از ساحل کمتر از هزینه یک روز شستشوی فیزیکی بود (۳). اصلاح زیستی همچنین یک تکنولوژی سازگار با محیط زیست است. زیرا از تجزیه زیستی نفت محصولات بی خطری مانند دی اکسیدکربن، آب و توده زیستی سلولی تولید می شود. در حالی که روش های فیزیکی و شیمیایی آلودگی را از بخشی از محیط به بخش دیگر منتقل می کنند.

از آنجایی که اصلاح زیستی بر مبنای فرایندهای طبیعی است، آسیب کمتری به ناحیه آلوده می رساند و در صورت استفاده صحیح فاقد اثرات جانبی نامطلوب است (٤ و ٥). در سال های اخیر، رودخانه قره سو به دلیل مجاورت با پالایشگاه نفت کرمانشاه دچار آلودگی نفتی شدیدی شده است. به طوری که حیات انسانی، جانوری و محیط زیست را در این منطقه با تهدید جدی مواجه ساخته است و نیازمند یک روش کارآمد برای پاکسازی می باشد. تاکنون باکتری های زیادی با قابلیت تجزیه اجزای نفتی جداسازی شده اند. اما بیشتر آن ها به تنهایی نمی توانند تمام اجزای نفت را تجزیه نمایند. بنابراین جداسازی باکتری هایی که بتوانند به طور اختصاصی و کارآمد تجزیه یکی از آلاینده های نفت را هدف قرار دهند و همچنین بتواند کمک به تجزیه دیگر آلاینده های نفتی نیز نماید، بسیار مطلوب به نظر می رسد. سمی ترین آلاینده های موجود در نفت خام که تهدید کننده جدی برای محیط زیست محسوب می شوند شامل هیدروکربن های آروماتیک به ویژه بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن می باشند. این چهار ترکیب را به اختصار BTEX (حروف ابتدای نام این ترکیبات)می نامند. بنابراین، جداسازی باکتری هایی که بتوانند به صورت اختصاصی و کارآمد این ترکیبات را هدف قرار دهند می تواند در این زمینه بسیار مفید واقع گردد (٦ و ٧).

از آنجایی که فرآیند پاکسازی زیستی در محیط زیست آزاد انجام می شود و دشوار بودن و حتی غیرممکن بودن کنترل شرایط محیطی، بهتر آن است که از باکتری های مقاومی استفاده شود که بتوانند شرایط نامساعد محیطی مانند دماهای گوناگون وگستره های مختلف pH و اسمولاریته های شدید را تحمل نمایند (۸). میکروارگانیسم های مختلف مسیرهای تجزیه ای متفاوت و اختصاصی را با توجه به شرایط هوازی یا بی هوازی محیط کسب نموده اند و به خوبی با محیط مورد نظر سازگار شده اند. بنابراین، بهتر آن است که برای هر آلودگی نفتی از باکتری های همان محل برای پاکسازی و تجزیه زیستی استفاده شود (۹). تا کنون مطالعات متعددی برای یافتن باکتری های کارآمد جهت پاکسازی آلودگی های نفتی و ترکیبات BTEX از محیط زیست انجام شده است. وانگ (Wang) و شائو (Shao) در سال ۲۰۰٦ توانستند ٤ سویه باکتریایی متعلق به جنس های *آسینتوباکتر* و *سودوموناس* را از لجن فعال پساب مزارع جداسازی نمایند. این جدایه ها قادر به تجزیه بنزن و تولوئن بودند (۱۰). موکرجی (Mukherjee) و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکتری *سودوموناس آیروجینوزا* را از خاک یک میدان نفتی واقع در ایالت آسام هندوستان جداسازی نمودند. این باکتری قادر بود انواعی از ترکیبات هیدروکربنی نفت را تحت شرایط محیطی مختلف تجزیه نماید (۱۱). همچنین، الوصیفی (Al-Wasify) و همکاران در سال ۲۰۱٤ ضمن این که نشان دادند طیفی از باکتری های متعلق به جنس های *سودوموناس*، *باسیلوس* و *اسینتوباکتر* قادر به تجزیه کارآمد ترکیبات موجود در نفت خام هستند، اثبات نمودند که استفاد از باکتری های بومی محل آلودگی نفتی برای پاکسازی زیستی می تواند بسیار مفید و پربازده باشد (۹).

از این رو هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده تولوئن از مناطق آلوده به نفت رودخانه قره سو واقع در شهر کرمانشاه بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها: در آذرماه سال ۱۳۹۳ نمونه برداری از خاک، آب و لجن فعال در محل ورود پساب پالایشگاه نفت کرمانشاه به رودخانه قره سو با استفاده از ظروف جمع آوری استریل صورت گرفت. بر روی ظرف هر یک از نمونه ها تاریخ نمونه برداری، محل و منبع نمونه ثبت گردید. سپس نمونه ها به منظور انجام آزمایش های بعدی به آزمایشگاه منتقل و در دمای ٤ °C نگهداری شدند (۱۲).

ب) آماده سازی محیط کشت انتخابی: ترکیبات محیط کشت انتخابی برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن در جدول ۱ آورده شده است. اسیدیته محیط کشت قبل از انجام اتوکلاو بر روی ۷ تنظیم شد. کلیه مواد محصول شرکت سیگمای آمریکا بودند. همانگونه که ملاحظه می شود، تنها منبع کربن در محیط کشت تولوئن بود (۱۲). در این مطالعه اجزاء تشکیل دهنده عناصر کمیاب شامل ۲۰ میلی‌گرم کلریدمس II، ۱۰۰ میلی‌گرم کلریدنیکل، ۲۰۰ میلی‌گرم کلریدکبالت، ۲٦ میلی‌گرم سلنیت‌سدیم، ۵۰ میلی‌گرم مولیبدات‌سدیم، ۳۰ میلی‌گرم ولفرامات‌سدیم، ۱۰ میلی‌گرم وانادات‌سدیم و ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵٪ در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود.

ج) غنی سازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن در محیط کشت انتخابی: مقدار ۲ گرم از هر یک از نمونه های خاک و لجن و ۲ میلی لیتر از هر یک از نمونه های آب در لوله های آزمایش جداگانه در حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استریل در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی لیتری اضافه شد و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ °C در انکوباتور شیکردار (۱۲۰ rpm) انکوبه گردید (۱۲). سپس ۲ میلی لیتر از محتوای هر ارلن برداشته شده و به ارلن های حاوی محیط کشت تازه انتخابی منتقل گردید. این مرحله دو بار تکرار گردید تا جمعیت باکتری های تجزیه کننده تولوئن به مقدار کافی افزایش یابد. در این مطالعه از کشت هایی حاوی نمونه هایی که در ۱۲۱ °C اتوکلاو شده بودند، محیط کشت هایی بدون افزودن نمونه و کشت های فاقد تولوئن خام به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت انتخابی برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن (در ۱۰۰ میلی لیتر).

مواد	مقدار
کلرید آمونیوم	۲۹/٤ میلی گرم
دی سدیم مونوهیدروژن فسفات	۳/٦ میلی گرم
سولفات آهن	۰/۱ میلی گرم
سولفات منیزیم	۲ میلی گرم
کلرید پتاسیم	۰/۵ میلی گرم
عصاره مخمر	۵۰۰ میلی گرم
تولوئن	۰/۵ میلی لیتر
عناصر میکرو	۱ میلی لیتر

د) خالص سازی کلنی ها: ابتدا فرم جامد همان محیط غنی سازی با استفاده از آگار (۱۰ گرم در حجم نهایی یک لیتر) تهیه گردید. پیش از جامد شدن محیط کشت، در شرایط استریل در داخل پلیت ها آلیکوت شد. سپس از هر یک از کشت های غنی شده، با استفاده از سرم فیزیولوژیک رقت های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه گردید. از هر کدام از رقت ها ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به روش کشت چمنی بر روی پلیت های جداگانه کشت داده شدند. پلیت ها هر روز صبح و عصر به منظور بررسی رشد یا عدم رشد کلنی ها بازدید شدند. به طور معمول پس از ۳ روز تک کلنی ها برداشته و جداگانه در پلیت های جدید به صورت خطی (چهار قسمتی) کشت داده شدند. این مرحله سه بار تکرار گردید تا اطمینان از خالص سازی کلنی ها حاصل شود (۱۳).

به منظور حفظ سویه های خالص سازی شده به منظور تکرار آزمون ها و مطالعات تکمیلی در آینده، ذخایری از جدایه های تجزیه کننده تولوئن تهیه شد. برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از کشت ۲٤ ساعته (محیط کشت نوترینت براث فاقد تولوئن) به ویال های انجمادی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول ٦۰ درصد اضافه گردید. پس از چند ثانیه ورتکس شدن آرام (به منظور پخش شدن سلول ها) نمونه ها برای استفاده های بعدی در دمای ۸۰ °C- نگهداری شدند (۱٤). دلیل استفاده از محیط کشت نوترینت براث به جای محیط کشت انتخابی در مرحله تهیه ذخایر انجمادی این است که فرایند انجماد به خودی خود برای سلول ها بسیار تنش زا بوده و از این رو باید

www.SID.ir

Archive of SID

از یک محیط غنی و دارای منابع کربن مغذی استفاده شود.

ه) شناسایی جدایه های تجزیه کننده تولوئن: جدایه ها به وسیله روش های مشاهده مورفولوژی کلنی ها، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی (کاتالاز، احیای نیترات، شرایط بی هوازی، آزمون اکسیداز–فرمنتاز، SIM، MR-VP، TSI، سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین و اوره آز) مطابق با استانداردهای شناسایی میکروبی ارزیابی شدند (۱۵). کتاب سیستماتیک باکتری شناسی برگی به عنوان مرجع شناسایی جدایه ها مورد استفاده قرار گرفت.

و) آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی 16S rDNA: در ابتدا استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation (محصول شرکت Roche، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. سپس به منظور تکثیر قطعه *16S rDNA* در نمونه ها از کیت Taq PCR Master Mix Kit (شرکت کیاژن، هلند) استفاده شد. از دو پرایمر عمومی با توالی های 16S F27: 5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و 16S R1492: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3' در واکنش PCR استفاده شد (۱۲). واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و محصولات به صورت باندهایی در زیر نور ماورای بنفش دستگاه ژل داک (بیوراد، آمریکا) مرئی شدند. در ادامه محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت سیناژن ارسال شدند. در نهایت، پس از ویرایش توالی های نوکلئوتیدی به وسیله نرم افزارهای BioEdit و SeqMan، این توالی ها به کمک نرم افزار Blast در پایگاه داده NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. میزان هومولوژی این توالی ها با دیگر توالی های مشابه موجود در GenBank مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی جدایه های باکتریایی با استفاده از نرم افزار Mega 6 رسم گردید.

ز) بررسی میزان تجزیه تولوئن با روش کروماتوگرافی گازی: میزان حذف تولوئن توسط جدایه ها با روش کروماتوگرافی گازی ارزیابی شد. برای این منظور از دستگاه Agilent Technologies 6890N (محصول شرکت Avondale، آمریکا) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله ای (flame ionization detection=FID) و تزریق کننده و ستون HP1 استفاده شد. گاز حامل مورد استفاده گاز هلیوم با فشار ۳٤ پوند بر اینچ مربع (psi)در مدخل تزریق بود. دمای آشکار ساز بر روی ۲٤۰ °C حفظ شد. درجه حرارت ستون از ٦۰ تا ۱۳۰ °C تنظیم شد، به طوری که به ازای هر دقیقه ۷ °C دما افزایش می یافت (۱٦). مشخصات ستون HP1: ۱۰۰٪ از جنس دی متیل پلی سیلوکسان، با طول ٦۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر بود.

ح) ارزیابی میزان مقاومت و شرایط بهینه رشد باکتری: اثر اسیدیته بر میزان رشد جدایه ها، با استفاده از محیط های کشت انتخابی با استفاده از دامنه های pH، ۵ تا ۱۱ اندازه گیری شد. دمای بهینه رشد نیز با کشت باکتری ها در محیط کشت انتخابی در دامنه دمایی ٤ °C تا ۵۰ °C تعیین شد. اثر غلظت نمک بر روی رشد نیز در دامنه شوری بین ۱٪ تا ۲۰٪ سنجش شد. برای اندازه گیری میزان رشد باکتری ها از روش کدورت سنجی در طول موج ٦۰۰ نانومتر استفاده گردید (۱٦).

ط) تجزیه سایر ترکیبات نفت خام: برای بررسی توان تجزیه ای جدایه ها در مواجهه با دیگر آلاینده های نفتی، ۱۰۰ میکرولیتر ، سوسپانسیون باکتریایی دارای غلظت ۰/۵ مک فارلند به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت انتخابی افزوده شد. به طوری که در هر آزمایش به جای تولوئن از یک آلاینده نفتی دیگر استفاده شد. این آلاینده ها شامل: نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن بودند. به منظور اندازه گیری میزان رشد باکتری ها از روش کدورت سنجی در طول موج ٦۰۰ نانومتر استفاده گردید (۱٦).

www.SID.ir

Archive of SID

ی) آنالیز آماری داده ها: تمامی آزمون ها با سه بار تکرار انجام شد. به منظور مقایسه میانگین مقادیر به دست آمده از داده های حاصل، از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey's Test در نسخه بیست و یکم نرم افزار SPSS استفاده گردید. مقدار P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند.

یافته ها

الف) جداسازی باکتری های تجزیه کننده تولوئن: به طور کلی با روش غنی سازی در محیط حاوی تولوئن (به عنوان تنها منبع کربن) ۲ جدایه از نمونه های گرفته شده از محل ورود پساب پالایشگاه به رودخانه قره سو به دست آمد. هر دو نمونه از نمونه های لجن فعال به دست آمدند و از نمونه های آب و خاک هیچ باکتری تجزیه کننده تولوئن به دست نیامد.

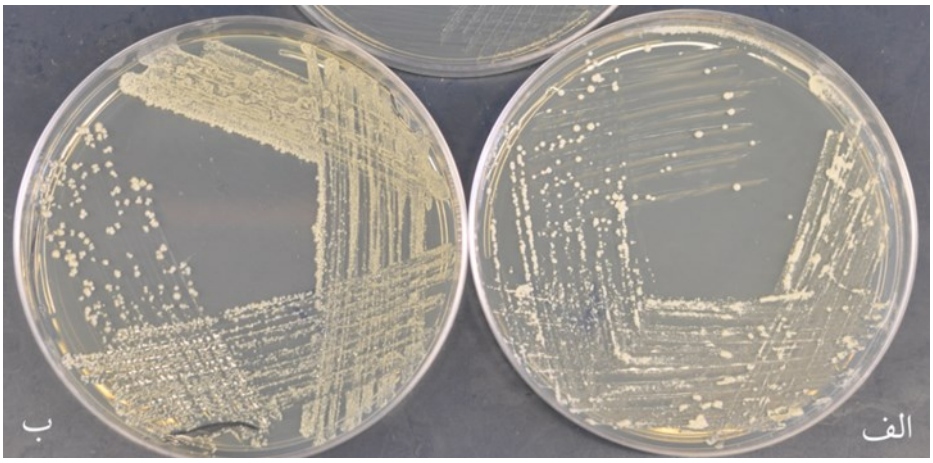
ب) مورفولوژی جدایه های تجزیه کننده : دو جدایه تجزیه کننده تولوئن به مدت ٤٨ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار (فاقد تولوئن) کشت داده شدند. کلنی هایی گرد، کرم رنگ و با حاشیه صاف حاصل شدند که در مجموع نشان دهنده هوازی بودن این باکتری ها بود (شکل ۱).

ج) نتایج رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی: نتایج رنگ آمیزی گرم نشان داد که هر ۲ جدایه باکتری هایی میله ای شکل و گرم منفی می باشند. نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای ۲ جدایه تجزیه کننده تولوئن در جدول ۲ آمده است. دو جدایه به دست آمده در این مطالعه، در تمامی آزمون های بیوشیمیایی کاملاً بر هم منطبق بودند.

د) نتیجه استخراج DNA و تکثیر قطعه 16S rDNA: کیفیت DNA استخراج شده و نیز محصول PCR (قطعه *16S rDNA*) با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند. همانگونه که ملاحظه می شود، گسترش (اسمیر) DNA واضح و پررنگ نشان دهنده کیفیت بالای استخراج است (شکل ۲-الف). همچنین باندهای پر رنگ با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز (طول مورد انتظار) نشان دهنده کمیت و کیفیت بالای مرحله PCR می باشد (شکل ۲-ب).

ه) آنالیز فیلوژنتیکی 16S rDNA: درخت فیلوژنیتیکی جدایه ها با توجه به نتایج به دست آمده از بلاست توالی های *16S rDNA* مورد نظر در پایگاه داده NCBI، با استفاده از نرم افزار MEGA6 رسم شد (شکل ۳). درصدهایی که در محل گره ها مشاهده می شود نشان دهنده احتمال صحت درخت فیلوژنتیکی است. بر این اساس، به احتمال بسیار بالا جدایه های ۱ و ۲ سویه های باکتری *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) می باشند.

و) میزان تجزیه تولوئن با روش کروماتوگرافی گازی: با توجه به کروماتوگرام زیر، جدایه های ۱ و ۲ قادر به کاهش معنی دار میزان تولوئن در محیط کشت بودند. این مساله توان بالای این



شکل ۱: کشت جدایه های تجزیه کننده تولوئن بر روی محیط نوترینت آگار. الف) جدایه ۱ ب) جدایه ۲.

www.SID.ir

Archive of SID

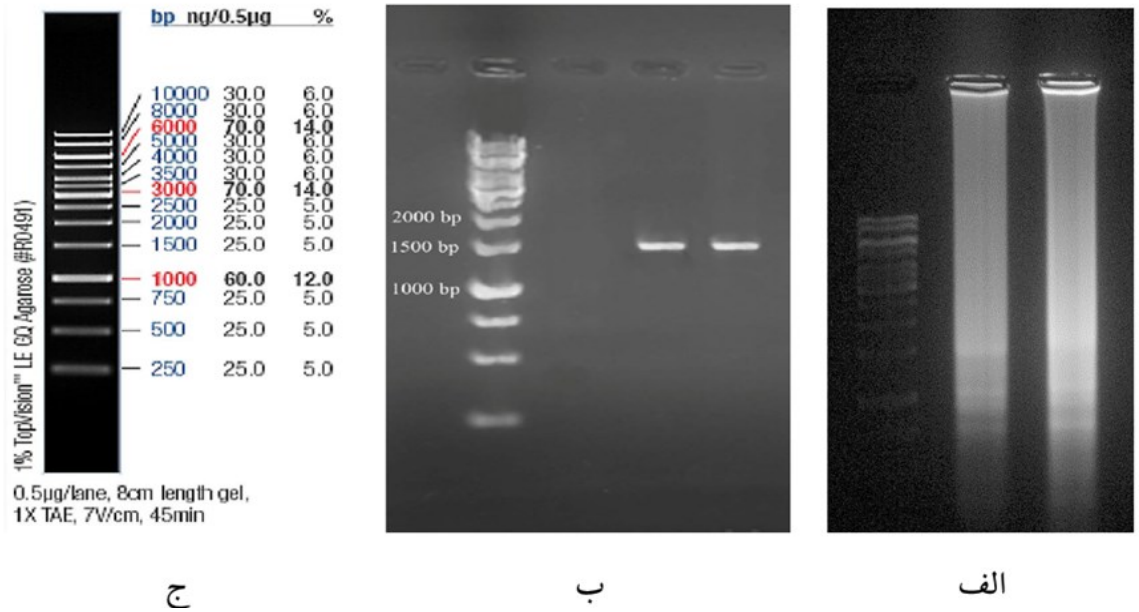
جدایه ها در تجزیه تولوئن را نشان می دهد (شکل ٤). مقادیر کمی شده از پیک های تولوئن در نمودار ۱ نشان داده شده است. در این نمودار مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد برای سه تکرار ارائه شده اند. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. $p^{***}<۰/۰۰۱$ نشان دهنده

جدول ۲: آزمون های بیوشیمیایی جدایه های تجزیه کننده تولوئن.

آزمون های بیوشیمیایی	جدایه ۱	جدایه ۲
کاتالاز	+	+
احیای نیترات	–	–
رشد در شرایط بی هوازی	–	–
اکسیداز– فرمنتاز	اکسیداتیو	اکسیداتیو
SIM		
سولفید	–	–
اندول	–	–
حرکت	+	+
MR	–	–
VP	–	–
TSI		
گلوکز	+	+
ساکارز	–	–
لاکتوز	–	–
سیترات	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+
هیدرولیز ژلاتین	–	–
اوره آز	–	–

اختلاف معنی دار جدایه های ۱ و ۲ با کنترل ۱ هستند. اختلاف معنی داری بین کنترل ۱ و ۲ از لحاظ سطح تولوئن وجود نداشت.

ز) تعیین میزان مقاومت و شرایط بهینه رشد باکتری: نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف نمک طعام بر روی جدایه ۱ نشان داد که بهترین غلظت نمک برای رشد غلظت ۱٪ بود. هر چند، این جدایه قادر بود در غلظت ۱۵٪ نیز تا حدودی به رشد خود ادامه دهد (شکل ۵). شایان یادآوری است که در این آزمون و تمامی آزمون های بعدی به دلیل کارایی نسبتاً بالاتر و نیز نتایج بسیار مشابه، تنها به ارائه نتایج جدایه ۱ بسنده شد. همچنین نتایج بررسی اثر دامنه های مختلف pH محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱ نشان داد که میزان pH بهینه برای رشد و فعالیت آن pH خنثی (pH ۷) است. به علاوه، این جدایه قادر بود در دو سوی دامنه pH ۵ تا ۱۱ فعالیت و رشد خود را (هر چند به میزان محدودتر نسبت به pH بهینه) حفظ نماید. هرچند، نتایج حاکی از آن بود که جدایه مورد نظر نسبت به دامنه های pH اسیدی بسیار حساس است. به طوری که با تغییر pH از ۷ به ۵، رشد و فعالیت باکتری دچار افت بسیار شدیدی شد (شکل ٦). نتایج بررسی اثر دماهای مختلف کشت بر روی رشد

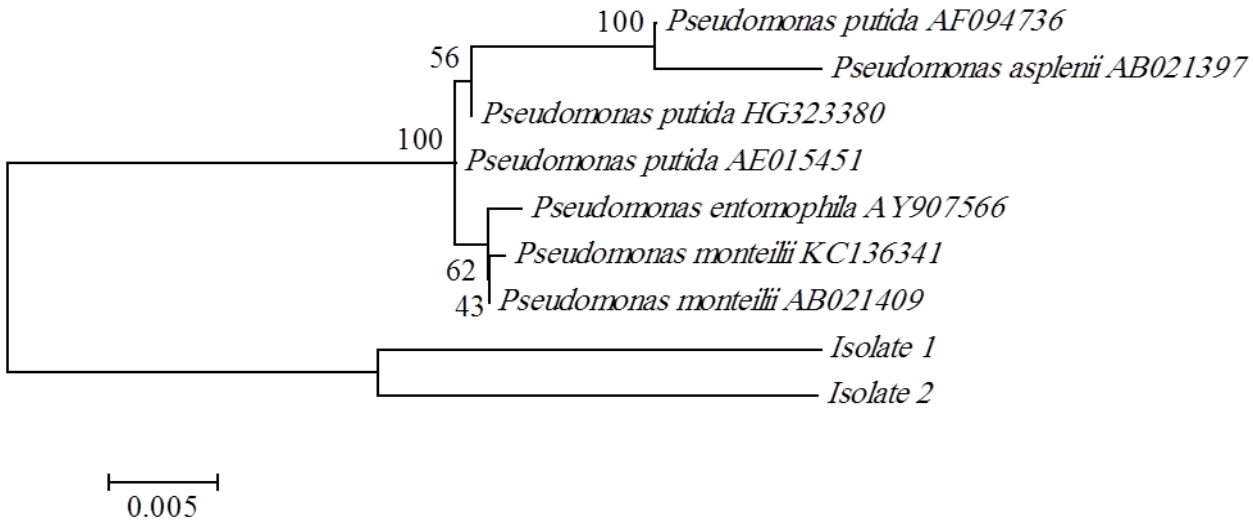


ج ب الف

شکل ۲: نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. الف) اسمیر DNA های استخراج شده از جدایه ها، ب) محصولات PCR جدایه ها، ج) مشخصات مارکر وزن مولکولی مورد استفاده شده در ژل محصولات PCR.

www.SID.ir

Archive of SID



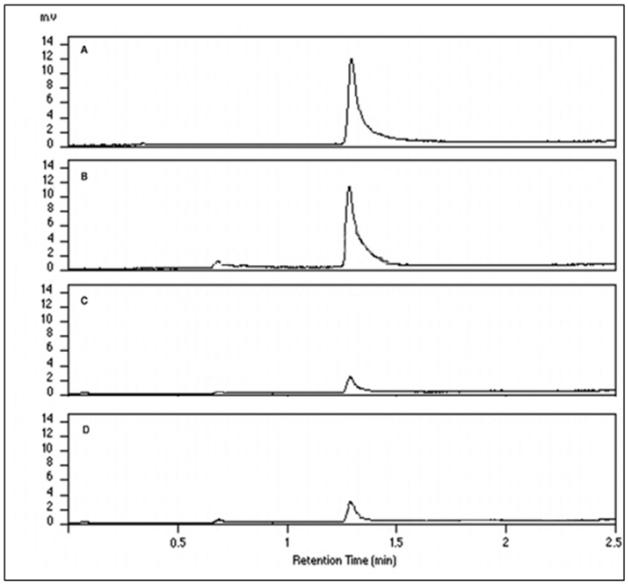
شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی جدایه ها بر اساس نتایج بلاست توالی *16S rDNA* با توالی های مشابه موجود در سایت NCBI با استفاده از نرم افزار Mega 6.

جدایه ۱ نیز نشان داد که دمای بهینه رشد برای آن ۲۸ °C است. همچنین، جدایه ۱ قادر بود در دو سوی دامنه دمایی ٤ °C تا ٥٠ °C فعالیت و رشد خود را به میزان محدودتری در مقایسه با دمای بهینه حفظ نماید (شکل ۷).

ح) ارزیابی تجزیه سایر ترکیبات نفت خام توسط جدایه ۱: نتایج نشان داد که جدایه ۱ قادر به استفاده از آلاینده های نفتی مختلف(نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن) به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده و تجزیه قابل توجه آن ها می باشد (شکل های ۸ و ۹).

بحث

هیدروکربن های نفتی (به ویژه هیدروکربن های آروماتیک نفت) از رایج ترین آلاینده های زیست محیطی هستند که طی فعالیت های مختلفی مانند اکتشاف، حمل و نقل، ذخیره سازی و فرآوری نفت خام، وارد محیط زیست شده و تهدید بزرگ برای اکوسیستم های آبی و خشکی به وجود می آورند (۱۷ و ۱۸). بدین ترتیب رها شدن نفت به مقدار زیاد به محیط های آبی و تخریب محیط زیست، نیاز روز افزون به فناوری های پاکسازی سازگار با محیط زیست را برای رفع آلاینده های هیدروکربنی برجسته تر می سازد. در مقایسه با سایر فناوری ها، استفاده از میکروارگانیسم ها در تجزیه ترکیبات



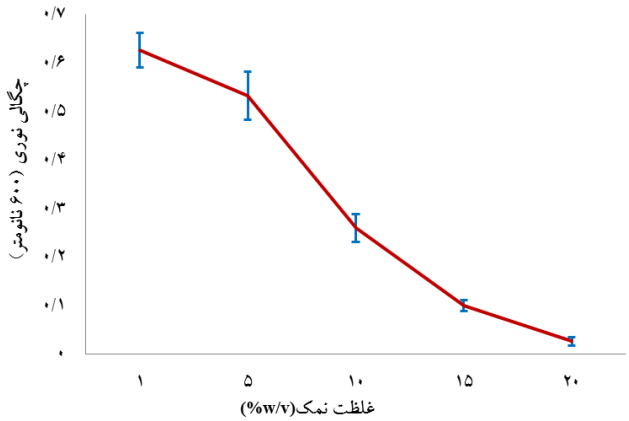
الف

شکل ٤: نتایج روش کروماتوگرافی. پیک های A تا D حاصل از تولوئن در ثانیه ۸۰ که به ترتیب نشان دهنده سطح تولوئن کنترل ۱ (محیط کشت مایع انتخابی عاری از باکتری)، کنترل ۲ (کشت مایع انتخابی حاوی باکتری *E.coli*)، کشت مایع حاوی جدایه ۱ و کشت مایع انتخابی جدایه ۲ پس از ۷۲ ساعت هستند.

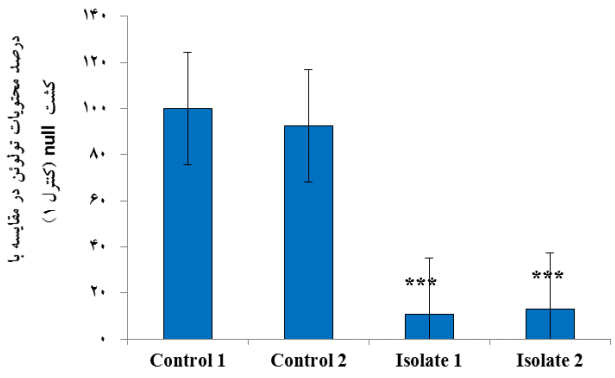
سمی، روشی کارآمد، کم هزینه و مؤثر در نظر گرفته می شود (٤ و ٥). از این رو، هدف ما در پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری هایی بود که علاوه بر تجزیه کارآمد تولوئن، بتوانند شرایط سختی همچون دماهای بالا، دامنه نسبتاً وسیع pH و غلظت های یونی بالا را تحمل نمایند.

www.SID.ir

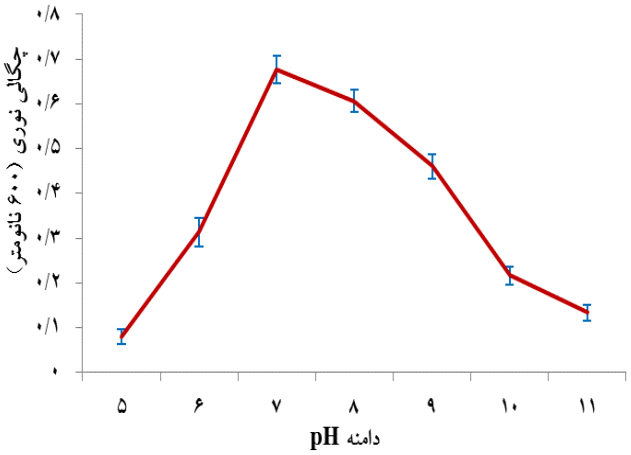
Archive of SID



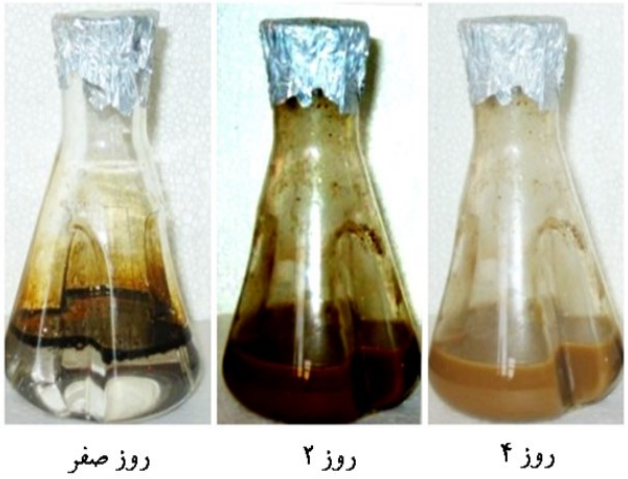
شکل ۵: اثر غلظت نمک محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱.



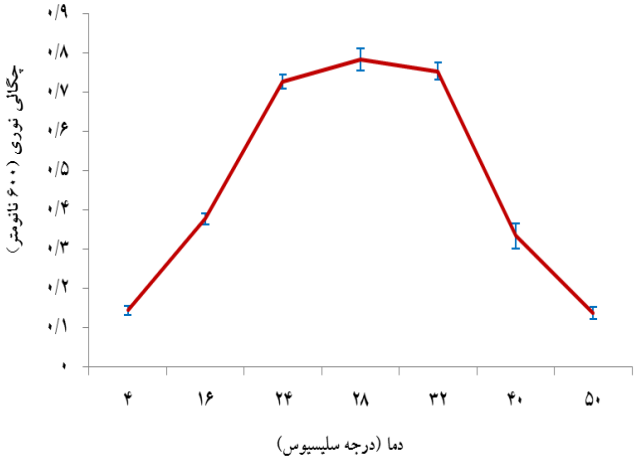
نمودار ۱: مقادیر کمی شده از پیک های تولوئن.



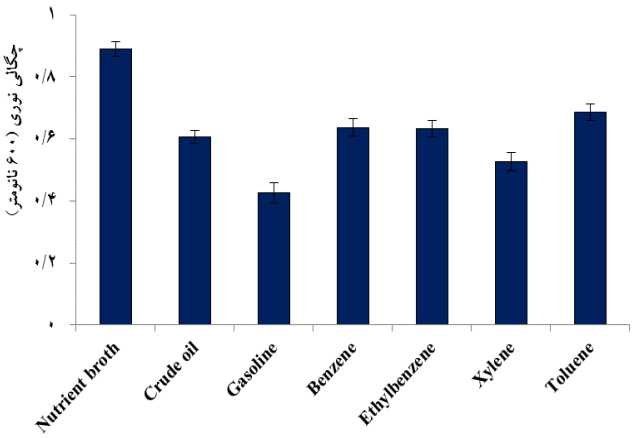
شکل ۶: میزان رشد جدایه ۱ در دامنه های pH، ۵ تا ۱۱ بر اساس کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر.



شکل ۸: مصرف نفت خام توسط جدایه ۱ پس از چهار روز.



شکل ۷: میزان رشد جدایه ۱ در دامنه دمایی ٤ °C تا ٥٠ °C بر اساس کدورت سنجی در طول موج ٦٠٠ نانومتر.



شکل ۹: میزان رشد جدایه ۱ بر روی آلاینده های نفتی. محیط کشت نوترینت براث و تولوئن به منظور مقایسه در دو سوی نمودار قرار داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم های مختلف مسیرهای تجزیه ای متفاوت و مختص به خود را با توجه به شرایط هوازی یا بی هوازی محیط کسب نموده اند و به خوبی با محیط مورد نظر سازگار شده اند. بنابراین، بهتر است که برای هر آلودگی نفتی از باکتری های همان محل برای پاکسازی و تجزیه زیستی استفاده شود (۹).

در پژوهش حاضر جهت پاکسازی آلودگی نفتی رودخانه قره سو، از همان محل باکتری های تجزیه کننده تولوئن جداسازی گردید. با استفاده از روش غنی سازی بر روی محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن، دو جدایه باکتریایی تجزیه کننده تولوئن به دست آمد. شناسایی جدایه های یاد شده با روش های مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، آزمون های بیوشیمیایی و در نهایت آنالیز *16S rDNA* صورت گرفت. در مجموع نتایج نشان دادند که جدایه های ۱ و ۲ با قطعیت مربوط به گونه باکتریایی *سودوموناس پوتیدا* بودند.

هرچند، با توجه به میزان هومولوژی ۱۰۰٪ توالی *16S rDNA* این جدایه ها با توالی مشابه در دیگر سویه های *سودوموناس پوتیدا* موجود در سایت NCBI، احتمال جدید بودن سویه ها بعید به نظر می رسد. شایان یادآوری است که نتایج آنالیز *16S rDNA* کاملاً با نتایج آزمون های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم سازگار و همسو بود. شایان ذکر است که در همین زمینه، مطالعات پیشین نشان داده اند که باکتری *سودوموناس پوتیدا* یکی از کارآمدترین باکتری ها در تجزیه تولوئن هستند (۱۹ و ۲۰). نتایج کروماتوگرافی گازی پیک های مربوط به تولوئن را در ثانیه ۸۰ نشان داد و حاکی از آن بود که جدایه های ۱ و ۲ قادر هستند به ترتیب در حدود ۸۹٪ و ۸۷٪ از تولوئن موجود در محیط کشت را مدت ۷۲ ساعت تجزیه نمایند. این نتایج، علاوه بر همخوانی با مطالعات مشابه پیشین (۲۱)، حاکی از کارایی بالای گونه *سودوموناس پوتیدا* در تجزیه تولوئن در مقایسه با دیگر گونه های باکتریایی بودند (۲۲).

این برتری را می توان به وجود ژن های اپرون *tod*، پلاسمید Tol و نیز کارایی بالای ژن های کاتالاز و اکسیداز آن نسبت داد. هرچند، این امر نیاز به بررسی های بیشتر و اثبات از طریق روش های مهندسی ژنتیک دارد (۱۹، ۲۱ و ۲۳). پس از اثبات کارایی جدایه ها در تجزیه تولوئن، میزان مقاومت آن ها در شرایط نامساعد دما، pH و اسمولاریته ارزیابی شد. در تمام این بررسی ها به دلیل کارایی نسبتاً بالاتر و نیز نتایج بسیار مشابه، تنها به ارائه نتایج جدایه ۱ بسنده شد.

نتایج بررسی اثر غلظت های مختلف نمک طعام نشان داد که جدایه ۱ قادر است تا غلظت ۲۰٪ نمک را در محیط کشت تحمل نماید. نتایج بررسی اثر دماهای مختلف کشت بر روی رشد جدایه ۱ نیز نشان داد این جدایه قادر است دامنه دمایی ٤ °C تا ٥٠ °C را تحمل نماید. در همین زمینه همالتا (Hemalatha) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که گونه های *سودوموناس* قادرند در دمای ٤٠ تا ٤٥ °C فعالیت مطلوبی داشته باشد (٢٤). این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در نهایت، نتایج بررسی اثر pH های مختلف محیط کشت بر روی رشد جدایه ۱ نشان داد که این جدایه می تواند دامنه pH معادل ۵ تا ۱۱ تحمل نماید. هرچند میزان حساسیت این جدایه به pH اسیدی بیشتر بود. این یافته با نتایج مطالعات پیشین همخوانی داشت. این امر می تواند به دلیل حساسیت ذاتی این باکتری به تغییر pH درون سلولی باشد. به طوری که بیان ژن های آن را تحت تأثیر قرار می دهد (۲۵).

اما می توان گفت در مجموع جدایه ۱ توان قابل قبولی در مواجهه با شرایط نامساعد محیطی دارد که آن را برای استفاده در پاکسازی زیستی مناسب می کند. میزان کارایی این باکتری برای تجزیه دیگر آلاینده های نفتی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، جدایه ۱ به جای تولوئن، بر روی محیط های کشت انتخابی واجد سایرآلاینده نفتی رشد داده شد. این آلاینده ها عبارت بودند از: نفت خام، گازوئیل، بنزن، اتیل بنزن، زایلن. همچنین، جدایه ۱ بر روی محیط کشت نوترینت براث و محیط کشت انتخابی حاوی تولوئن رشد داده شد و به عنوان کنترل و جهت مقایسه قرار داده شد. برای اندازه گیری میزان رشد باکتری ها از روش کدورت سنجی در طول موج ٦٠٠ نانومتر استفاده گردید.

مشاهده شد که جدایه ۱ به طور کارآمدی قادر به رشد بر روی تمام آلاینده های یاد شده بود و در مقایسه با محیط ها کشت

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل افت قابل توجهی نشان نداد. بنابراین، جدایه ۱ قادر است در حضور دیگر آلاینده ها نیز عملکرد و فعالیت خود را حفظ نماید و حساسیت خاصی نسبت به این آلاینده ها ندارد. این بخش از مطالعه حاضر نیز با پژوهش های پیشین که به بررسی توان باکتری *سودوموناس پوتیدا* در تجزیه ترکیبات نفتی پرداخته بودند همسو بود.

به عنوان نمونه، یو (You) و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سویه YNS1 باکتری *سودوموناس پوتیدا* که از خاک آلوده به نفت جداسازی شده بود، قادر است تجزیه زیستی ترکیبات BTEX را به نحو کارآمدی انجام دهد (۲۶). کمترین میزان رشد در حضور آلاینده های نفتی مورد آزمایش مربوط به گازوئیل بود. هرچند، که گازوئیل حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات آروماتیک است و این امر در ابتدا کمی عجیب به نظر می رسد؛ اما احتمالاً این امر ناشی از وجود مقادیر بالای سرب در گازوئیل مورد استفاده بوده است. هرچند، این امر نیازمند بررسی های بیشتر است که در مطالعه حاضر امکان بررسی آن وجود نداشت. در ادامه، پیشنهادهایی برای انجام مطالعات آینده در این زمینه ارائه می گردد که می توانند مفید واقع شوند. در اولین گام، بررسی میزان حذف دیگر آلاینده های نفتی توسط جدایه های ۱ و ۲ ضروری به نظر می رسد. همچنین، بررسی کارایی جدایه های ۱ و ۲ در میدان عمل (آلودگی نفتی رودخانه قره سو و دیگر آلودگی های نفتی) باید آزموده شود. به علاوه، مقایسه جدایه های ۱ و ۲ با دیگر باکتری های تجزیه کننده تولوئن به صورت دقیق تر و تحت شرایط یکسان می تواند به شناخت بهتر مزایا و معایب جدایه های ۱ و ۲ کمک نماید. در این صورت، افزایش میزان کارایی و نیز مقاومت جدایه های ۱ و ۲ توسط روش های مهندسی ژنتیک نیز می تواند راهکار مؤثری به منظور تقویت نقاط قوت و برطرف نمودن نقاط ضعف این دو سویه باشد. همچنین شناسایی دقیق مسیرهای آنزیمی و ژن های دخیل در متابولیسم ترکیبات نفتی جدایه های ۱و ۲ نیز می تواند در این زمینه می تواند راهگشا باشد.

نتیجه گیری

در مجموع می توان از این مطالعه چنین نتیجه گرفت که جدایه های ۱ و ۲ با توجه به توانایی رشد در غلظت بالای تولوئن و تجزیه طیف وسیعی از آلاینده های نفتی گزینه های مناسبی برای پاکسازی آلودگی های نفتی محیط زیست هستند. به ویژه اینکه جدایه های ۱ و ۲ علاوه بر کارایی بالا در تجزیه آلاینده های نفتی، دارای توان سازگاری نسبتاً بالایی با شرایط مختلف اسمزی، دمایی و اسیدیته نیز می باشند. این امر آن ها را به گزینه های مطلوبی برای استفاده در شرایط اقلیمی و محیط های گوناگون تبدیل می نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج به دلیل حمایت های مادی و معنوی کمال امتنان را دارند.

References

1. Atlas RM. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. Marine Pollution Bull. 1995; 31(4): 178-182.

2. Hinchee RE, Kittel JA, Reisinger HJ. Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons. Battelle Press, Columbus, OH (United States), 1995.

3. Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K. Petroleum biodegradation in marine environments. J Mol Microbiol Biotechnol. 1999; 1(1): 63-70.

4. Mohajeri L, Aziz HA, Isa MH, Zahed MA. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. Bioresource Technol.

www.SID.ir

Archive of SID

2010;101(3):893-900.

5. Zhou J, Yu X, Ding C, Wang Z, Zhou Q, Pao H. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. J Environ Sci. 2011; 23(1): 22-30.

6. Jin HM, Choi EJ, Jeon CO. Isolation of a BTEX-degrading bacterium, Janibacter sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. Bioresource Technol. 2013;145: 57-64.

7. Weelink SB, van Eekert MA, Stams AM. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. Rev Environ Sci Biotechnol. 2010; 9(4): 359-385.

8. Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 56(5-6): 650-663.

9. Al-Wasify RS, Hamed SR. Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. Int J Bacteriol. 2014. Doi: 10.1155/2014/863272

10. Wang L, Shao ZZ. Isolation and characterization of 4 benzene/toluene-degrading bacterial strains and detection of related degradation genes. Acta Microbiologica Sinica. 2006; 46(5): 753-757.

11. Mukherjee S, Bardolui NK, Karim S, Patnaik VV, Nandy RK, Bag PK. Isolation and characterization of a monoaromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* from crude oil. Journal of environmental science and health Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. 2010; 45(9): 1048-1053.

12. Wang L, Qiao N, Sun F, Shao Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. Extremophiles : life under extreme conditions. 2008; 12(3): 335-342.

13. Kim JM, Jeon CO. Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethylbenzene degrading bacterium, Acinetobacter sp. B113. Current microbiology. 2009; 58(1): 70-75.

14. Afrouzossadat HA, Giti E, SeyedMahdi G. The role of exopolysaccharide, biosurfactant and peroxidase enzymes on toluene degradation by bacteria isolated from marine and wastewater environments. Jundishapur J Microbiol. 2012; 3: 479-485.

15. Slepecky RA, Hemphill HE. The genus *Bacillus*- nonmedical. The prokaryotes: Springer; 2006; pp: 530-562.

16. Abari AH, Emtiazi G, Ghasemi SM, Roghanian R. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading bacterium exhibiting potential application in bioremediation. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(3): 256-261.

17. Eghtesadi-Araghi P, Haffner P, Drouillard K, Maghsoudlou W. Polycyclic aromatic hydrocarbons contaminants in Black-lip (Pearl) Oyster *Pinctada margaritifera* from Kish Island (Persian Gulf). Iran J Fisheries Sci. 2011; 10(1): 25-34.

18. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bull. 2012; 64(1): 7-12.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Inoue A, Yamamoto M, Horikoshi K. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. Appl Environ Microbiol. 1991; 57(5): 1560-1562.

20. Robledo-Ortíz JR, Ramírez-Arreola DE, Pérez-Fonseca AA, Gómez C, González-Reynoso O, Ramos-Quirarte J. Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. Int Biodeterioration Biodegradation. 2011; 65(3): 539-546.

21. Worsey MJ, Williams PA. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J Bacteriol. 1975; 124(1): 7-13.

22. Rahman RN, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. J Indust Microbiol Biotechnol. 2007; 34(7): 509-517.

23. Zylstra GJ, McCombie WR, Gibson DT, Finette BA. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the tod operon. Appl Environ Microbiol. 1988; 54(6): 1498-1503.

24. Hemalatha S, Veera Manikandan P. Characterization of aromatic hydrocarbon rading bacteria from petroleum contaminated sites. J Environ Protection. 2011; 2(03): 243.

25. Reva ON, Weinel C, Weinel M, Böhm K, Stjepandic D, Hoheisel JD. Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. J Bacteriol. 2006; 188(11): 4079-4092.

26. You Y, Shim J, Cho CH, Ryu MH, Shea PJ, Kamala-Kannan S. Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil. J Basic Microbiol. 2013; 53(5): 469-475.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Original Article

Isolation and identification of toluene-degrading bacteria from oil spills of Gharehsoo River located in Kermanshah city

Narges Shamsi[1], Roya Moravej[2]

[1]MS.c., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Biodegradation is one of the most useful methods for elimination of oil spills and is recently considered as a promising approaches due to numbers of advantages, including low costs, high efficiency and being environment friendly. Gharehsoo river is one of those regions which have been contaminated by oil spills during recent years due to its vicinity to Kermanshah Oil Refining Company. This study was aimed to isolate and identify the toluene-degrading bacteria from oil spills in Gharehsoo river located at Kermanshah city.

Materials & Methods: In this experimental study, the samples were collected from water, soil and active sludge of the contaminated areas. Two isolates were achieved by enrichment of the samples into a selective medium containing toluene. Then, the isolates were identified using morphology, Gram staining, biochemical methods and *16S rRNA* sequencing. Also, the ability of isolates to eliminate toluene was testes based on Gas chromatography.

Results: Both isolates were identified as *Pseudomonas putida* strains. Gas chromatography tests showed that the isolates 1 and 2 were able to degrade toluene into the selective medium (0.5% v/v) 89% and 87%, at 72 C, respectively. The isolates were also able to resist and grow under harsh conditions of temperature, pH and osmolality. It was proved that the isolates were able to continue their activity and growth in the presence of other crude oil pollutants (benzene, xylene, ethyl-benzene).

Conclusion: Our results showed that these isolates were very efficient for elimination of oil pollutants due to their high growth rate in the presence of relatively high toluene concentration and to the ability to degrade a wide range of oil toxic compounds.

Keywords: Biodegradation, Toluene, Oil refinery sewage, Gharehsoo river, *Pseudomonas putida*.

Correspondence to: Roya Moravej

Tel: +98 9183718474

E-mail: roya.sanandaj@gmail.com

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 156-168.

www.SID.ir