مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره سوم (پیاپی ۲۸) پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۲۴۶-۲۳۶

Original Article

جداسازی و شناسایی فیلوژنتیکی باکتری های بومی نفت خوار از خاک منطقه کارون اهواز

محمد حسین آرش اسدی راد[۱]، مهناز مظاهری اسدی*[۲]، حمید راشدی[۳]، طاهر نژادستاری[۴]

[۱]دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، [۲]استاد، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، تهران، [۳]دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، [۴]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: زیست پالایی روشی مقرون به صرفه و پاک به منظور تیمار مکان های آلوده است و می تواند منجر به معدنی شدن هیدروکربن ها گردد. میکروب های بومی موجود در منطقه می توانند نقش مؤثری در این رابطه ایفا نمایند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی فیلوژنتیکی باکتری های بومی نفت خوار از خاک منطقه کارون اهواز انجام شد.

مواد و روش ها: خاک آلوده به نفت منطقه کارون اهواز به صورت تصادفی و در شرایط استریل نمونه برداری شد. مقدار فسفر قابل جذب با استفاده از روش اولسن و مقادیر کربن، هیدروژن و نیتروژن توسط دستگاه CHN meter تعیین گردید. محیط کشت نمک های معدنی حاوی ۲ درصد نفت خام به منظور جداسازی باکتری های نفت خوار استفاده شد. سویه نفت خوار با استفاده از روش چاهک گذاری غربال گردید. نمونه خاک با استفاده از روش سوکسله عصاره گیری و میزان کربن کل توسط روش کروماتوگرافی گازی مورد سنجش قرار گرفت. به منظور شناسایی سویه باکتریایی برتر از آزمون های بیوشیمیایی و روش مولکولی PCR استفاده گردید.

یافته ها: در این مطالعه تعداد ٤٤ سویه باکتریایی جداسازی گردید. در غربالگری اولیه ۲۰ و در غربالگری ثانویه یک جدایه انتخاب و S31 نام گرفت. جدایه مورد نظر *باسیلوس لیکنی فورمیس* گزارش شد. جدایه منتخب نسبت به سویه استاندارد در محیط حاوی ۲ درصد نفت خام رشد بهتری داشت. به طوری که نفت خام را در مدت زمان ۳۰ روز گرماگذاری در دمای تقریبی ۳۰ درجه سلسیوس به میزان ۸٤ درصد تجزیه نمود.

نتیجه گیری: *باسیلوس* منتخب می تواند از ۲ درصد نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نماید. مطالعه فراتر آن در اجتماع باکتریایی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: زیست پالایی، نفت خام، کروماتوگرافی گازی، باکتری های خاک.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۹۵

مقدمه

در فرآیند تأمین انرژی مورد نیاز بشر امروزی، منابع طبیعی گوناگونی مورد استفاده قرار می گیرند که در بین آن ها منبع اصلی انرژی، نفت و مشتقات آن می باشد. روزانه بالغ بر هفتاد و سه میلیون بشکه نفت در جهان تولید می شود. به طور میانگین ده درصد نفت استخراج شده در اثر حوادث مختلفی مانند اکتشاف، تولید، پالایش، شکستن خطوط انتقال و یا نشت مخازن ذخیره نفت در پالایشگاه ها، جنگ و سایر عوامل وارد اکوسیستم های آبی و خاکی شده و مشکلات زیست محیطی فراوانی ایجاد می نمایند. در سال ۲۰۱۰ میلادی، میزان خاک آلوده به نفت در ایران حدود یک میلیون و پانصد هزار متر مکعب گزارش گردید (۱).

از اثرات مخرب هیدروکربن های نفتی بر موجودات زنده می توان به سمیت، جهش زایی، سرطان زایی بالقوه و ورود به

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.
تلفن: ۰۹۱۲٦٨٦٩۳٤٥ پست الکترونیک: a_assadirad@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

چرخه های حیاتی اشاره نمود. بنابراین، پالایش آن از محیط زیست امری حیاتی به نظر می رسد (۲). حذف آلودگی های نفتی با سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی امکان پذیر است. در این میان استفاده از میکروارگانیسم ها در روش های پاکسازی محیط (زیست پالایی) بی خطر و مقرون به صرفه می باشد (۳). پاکسازی زیستی روش های مختلفی دارد که می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱-زیست پالایی طبیعی (Intrinsic Bioremediation): این فرآیند توسط میکروارگانیسم های طبیعی موجود در محیط و تحت شرایط طبیعی صورت گرفته و می تواند آلودگی را تا سطح قابل قبولی حذف نماید (۳).

۲- تحریک زیستی (Biostimulation): با هدف بهبود شرایط محیطی مانند افزودن مواد غذایی و یا هوادهی به منظور تحریک رشد میکروارگانیسم ها و افزایش سرعت تجزیه زیستی انجام می شود (۳).

۳- زیست فزونی(Bioaugmentation): افزودن میکروارگانیسم های غیر بومی به محیط آلوده جهت افزایش سرعت و گسترش تجزیه زیستی است. مورد اخیر در زمان عدم توانایی تجزیه مناسب میکروارگانیسم های بومی کاربرد دارد (۲ و ۳). بسیاری از محققین بر این عقیده اند که استفاده از میکروارگانیسم های بومی سازگار با مناطق آلوده به ترکیبات نفتی، به ویژه باکتری های نفت خوار، می توانند در پاکسازی خاک کارآمدتر از سایر ارگانیسم ها باشد (٤).

باکتری های بومی نفت خوار به واسطه پایداری و داشتن ترکیبات ترشحی مانند بیوسورفکتانت ها، کشش سطحی نفت را کاهش و آن را امولسیونه می کنند و سپس آن ها را به مواد ساده تری تبدیل می نمایند (۵). میزان زیست پالایی در چنین مناطقی به عواملی مانند جمعیت میکروبی، میزان و نوع آلودگی و شرایط شیمیایی موجود در منطقه آلوده بستگی دارد (٦). از نظر تجزیه پذیری، نفت خام متنوع بوده و به هیدروکربن های اشباع، هیدروکربن های آروماتیک، مواد قطبی غیر هیدروکربنی مانند رزین ها، پیریدین ها، کینولون ها ،کربازول ها، سولفوکسیدها و آمیدها، آسفالتن (فنل ها، اسیدهای چرب، کتون ها، استون ها و پورفیرین ها) تقسیم شده است (۷).

با توجه به نوع ترکیبات و تنوع نفت خام در مقاومت نسبت به فرآیند تجزیه شدن، جداسازی و غربال گری سویه میکروبی خاص با هدف استفاده از نفت خام و یا یک ترکیب ویژه از آن، یک اصل به حساب می آید. اگر سویه منتخب قادر به مصرف و تجزیه ترکیبات مورد نظر باشد، آنگاه ترکیب مورد نظر به عنوان منبع کربن و انرژی به همراه مواد غذایی معدنی مورد نیاز سلول مورد استفاده قرار می گیرد تا توده زیستی خود را تشکیل دهد. به این ترتیب، در عین حال که میکروب رشد می نماید، به تدریج آلودگی نیز از محیط حذف می گردد (۸).

موفقیت زیست پالایی نفت بستگی به توانایی حذف هیدروکربن ها و حفظ شرایطی دارد که میزان افزایش تجزیه زیستی را در محیط های آلوده تسهیل می کند. عوامل گوناگون مؤثر در میزان زیست پالایی نفت خام، توسط محققین متعددی مورد بررسی قرار گرفته است (۹). یکی از نیازهای مهم در این رابطه، وجود میکروارگانیسم هایی با ظرفیت های متابولیکی مناسب است. در صورت وجود چنین میکروارگانیسم هایی، با فراهم نمودن مقادیر بهینه رشد و تجزیه زیستی هیدروکربن در حضور غلظت های کافی از مواد غذایی، اکسیژن و pH، زیست پالایی به خوبی انجام خواهد گرفت.

ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نفت و نیز خاک منطقه، در تعیین میزان زیست پالایی مهم بوده و نقش مؤثری را بازی می کنند. میکروارگانیسم ها با تولید متابولیت های مختلفی مانند آنزیم ها، حلال ها یا عوامل فعال کننده سطحی در تجزیه انواع مختلف هیدروکربن ها نقش ایفا می کنند (۹). طی گزارشات به دست آمده از مناطق جغرافیایی متفاوت جدایه های متعددی از جمله سویه هایی متعلق به خانواده باسیلاسه مانند *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*)، *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*B. licheniformis*)، *باسیلوس پومیلوس* (*B. pomilus*) و *باسیلوس ترموکاتنولاتوس* (*B. thermocatenulatus*) با توانایی بالا در تجزیه ترکیبات متعددی مانند هیدروکربن های n-هگزادکان

Archive of SID

www.SID.ir

و نفتالن جداسازی شده است. طبق بررسی های به عمل آمده، هیدروکربن های نفتی توسط باکتری ها و مخمرها و قارچ ها مورد تجزیه قرار می گیرند. از این میان، باکتری ها با توان تجزیه ای ۱۳تا ۵۰ درصدی، فعال ترین عوامل تجزیه کننده نفت و نیز آغازگر فرایند تجزیه نفت معرفی شده اند. مطالعات بسیاری نشان می دهد که *باسیلوس* ها از فراوان ترین و مقاوم ترین جنس های باکتری به ویژه در محیط خاک های آلوده به شمار می آیند (۱۰-۸).

بنابراین، استفاده از میکروارگانیسم های بومی دارای قابلیت بالا در زیست پالایی نفت خام سازگار با تنش های محیطی موجود می تواند یک روش مناسب در حذف ترکیبات نفتی از مکان مورد نظر باشد. هدف از این پژوهش جداسازی و غربال گری میکروارگانیسم های مؤثر در زیست پالایی، از خاک منطقه آلوده به نفت و ارزیابی توان تجزیه آن ها در میکروکازم (محیط مصنوعی) افقی حاوی ۲ درصد نفت خام بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: از خاک آلوده به نفت منطقه کارون اهواز، در عمق تقریبی ۱۰ سانتی متری، به صورت تصادفی و در سه تکرار نمونه برداری شد. نمونه ها در کیسه های استریل جمع آوری و در دمای ٤ درجه سلیسیوس، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از الک استریل با منافذ ۲ میلی متری به منظور همگن سازی و حذف ذرات درشت خاک استفاده گردید (۱۱).

به منظور تعیین بافت و قابلیت هدایت الکتریکی خاک به ترتیب از محلول هگزا-متا فسفات سدیم به همراه کربنات سدیم و روش $ISIRI_{6831}$ استفاده شد. مقدار فسفر قابل جذب نیز با استفاده از روش اولسن مورد ارزیابی قرار گرفت. دستگاه CHN meter به منظور تعیین مقادیر کربن، هیدروژن و نیتروژن خاک به کار برده شد. عوامل دیگری مانند pH، رطوبت و ظرفیت نگهداری خاک نیز به طور جداگانه مورد سنجش قرار گرفت (١٤-١٢). همچنین تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک، آلمان تهیه گردید.

ب) جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام: به منظور جداسازی سویه های باکتریایی از خاک آلوده به نفت از محیط کشت MSM (Mineral Salt Medium) حاوی ۲ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده شد (۱ و ۱۵).

فلاسک های شیشه ای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و ۵ گرم گوی شیشه ای برای جداسازی باکتری از ۵ گرم خاک، تحت شرایط استریل مورد استفاده قرار گرفت. همگن سازی و تهیه سوسپانسیون در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر در دور ١٤٥ g صورت گرفت (۵ و ١٤). جداسازی سویه ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس در ٤٨-٢٤ ساعت انجام شد. کلنی های رشد کرده خالص سازی و ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن ها مورد بررسی قرار گرفت (١٦و ١٧).

ج) غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت خام: برای این منظور از روش چاهک گذاری و پلیت های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) با ١٢-٦ عدد چاهک استفاده شد. در ابتدا، سوسپانسیون کشت ٢٤ ساعته هر جدایه در محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) (OD_{600nm}=1) و نفت خام استریل به نسبت ۱/۳ و ۲/۳ در دو تکرار به چاهک ها اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ سلیسیوس گرمادهی شدند. برای غربال گری ثانویه از جدایه های رشد یافته در اطراف چاهک ها در مرحله قبل استفاده شد. در این مرحله، از فلاسک های شیشه ای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط نمک های معدنی (MSM) و ۱ میلی لیتر نفت خام، در شرایط استریل استفاده گردید. سپس، سوسپانسیون کشت ٢٤ ساعته باکتری در محیط کشت نوترینت براث (OD_{600nm}=1) و نفت خام استریل به ترتیب، در مقادیر ۵ و ۲ درصد به فلاسک ها تلقیح و به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور g ١٤٥ گرماگذاری گردید (٤ و١٥).

د) بررسی تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی: به منظور تجزیه زیستی بهتر و با استفاده از داده های حاصل از آنالیز خاک، به ترتیب مقادیر ۰/۷ $g.100mL^{-1}$ و ۲ درصد (V/W) اوره و نفت خام و نیز ۰/۳۸ $g.100mL^{-1}$ در مقادیر مساوی K_2HPO_4 و KH_2PO_4 به نمونه خاک افزوده شد. میزان تجزیه نفت خام به

Archive of SID

www.SID.ir

مدت ۱۲ هفته در دمای ۳۰ سلیسیوس مورد بررسی قرار گرفت. به منظور عصاره گیری نمونه های خاک از روش سوکسله (Soxhlet) و حلال آلی کلروفرم (مرک، آلمان) استفاده شد. میزان تجزیه کربن کل (Total Petroleum Hydrocarbon= TPH) موجود در عصاره های به دست آمده، توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (Varian-CP3800)، ستون کپیلاری CP-Sil-5 با قطر ۰/۳۲ mm و طول ۳۰ m، دتکتور FID، دمای اولیه و نهایی به ترتیب ۵۰ °C و ۲۰۰ °C در ۱۰ °C/min، ارزیابی گردید (۱۸).

ه) آزمون های بیوشمیایی جدایه های برتر: تعیین تقریبی هویت جدایه ها به کمک رنگ آمیزی گرم و آزمون های کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، آمیلاز، ژلاتیناز، کازئین، سیترات، VP، تخمیر زایلوز، گلوکز، آرابینوز، مانیتول و رشد در کلرید سدیم ۱۰-۲ درصد انجام شد (۱۶).

و) شناسایی فیلوژنتیکی سویه ها: برای این منظور جدایه های دارای بیش ترین میزان تجزیه به عنوان سویه های برتر انتخاب شدند. استخراج DNA بر روی کشت ۱۶ ساعته جدایه ها و با روش انجماد و جوش انجام گرفت (۱۹). به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای 5-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3 و 5-ATCGGTACCTTGTTACGACTTC-3 استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱۵۰ میکرومول dNTPs mix، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۱ میکرومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت (۲۰). واکنش PCR در دستگاه مستر سایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندرف آلمان و با شرایط دمایی ۲ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه انجام شد (۲۰ و ۱۹). محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شدند. سپس توالی های به دست آمده در NCBI مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱: آنالیز فیزیکوشیمیایی نمونه خاک.

ویژگی	نتیجه
بافت	شن (۸۵٪)، ماسه (۷٪)، رس (۸٪)
هدایت الکتریکی	۱/۰۲۵ ms/cm
pH	۷/۲۱
فسفر قابل جذب	۶/۴ ppm
کربن	۵/۶۷ درصد
هیدروژن	۰/۱۷ درصد
ازت	-

یافته ها

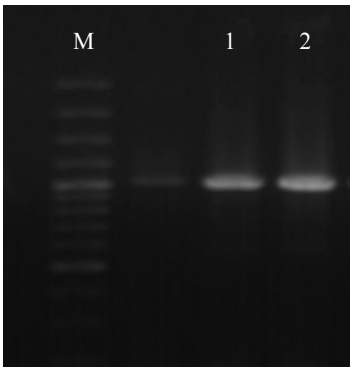
الف) آنالیز خاک: پس از انجام نمونه برداری در شرایط استریل، نمونه های خاک در آزمایشگاه از نظر ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مانند نوع بافت، هدایت الکتریکی، pH، میزان فسفر قابل جذب، کربن، هیدروژن و نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز خاک در جدول ۱ نشان داده شده است.

ب) جداسازی، غربال گری و شناسایی: در مراحل جداسازی اولیه، ۴۴ جدایه باکتریایی از خاک آلوده به نفت منطقه، به دست آمد. در غربال گری اولیه ۲۰ جدایه و در غربال گری ثانویه ۱ جدایه با بیش ترین میزان رشد در حضور ۲ درصد نفت خام به عنوان سویه برتر انتخاب و S_{31} نام گذاری گردید. بررسی های مورفولوژیکی نشان داد که جدایه S_{31} میله ای شکل، گرم مثبت و اسپوردار است. آزمون های بیوشیمیایی نیز حاکی از متحرک بودن و همچنین مثبت بودن واکنش آنزیم های کاتالاز، اکسیداز، آمیلاز، ژلاتیناز، پروتئاز، اوره آز و نیز قندهای گلوکز و آرابینوز داشتند. در حالی که مصرف سیترات، تولید متیل رد، اندول و آنزیم نیترات ردوکتاز و نیز تخمیر مانیتول و لاکتوز منفی گزارش شد. شایان یادآوری است که سویه منتخب S_{31} دارای فعالیت همولیتیکی نیز بود.

ج) آنالیز ژنتیکی جدایه برتر: نتایج توالی یابی ژن *16S rRNA* نشان داد که جدایه برتر تجزیه کننده نفت خام با ۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* جدایه S31. M: مارکر یک کیلوجفت بازی، ستون های ۱ و ۲) قطعات تکثیر شده با طول تقریبی ۱۰۰۰ جفت بازی.

درصد قرابت فیلوژنتیکی یک باکتری گرم مثبت به نام *باسیلوس لیکنی فورمیس* می باشد (شکل ۱).

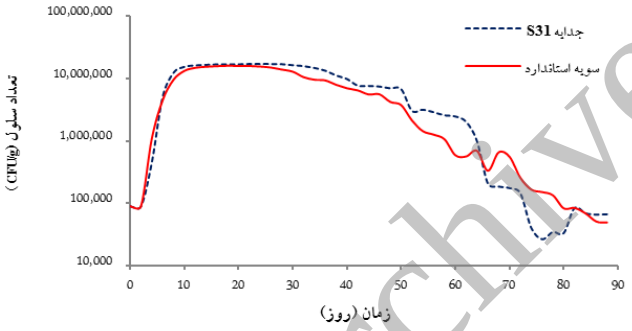
د) تجزیه زیستی نفت خام: نتایج حاصل از رشد سویه منتخب (S_{31}) و سویه استاندارد (*Bacillus megaterium* PTCC 1530) به عنوان شاهد در محیط کشت حاوی ۲ درصد نفت خام نشان داد که هر دو سویه باکتریایی در شرایط یکسان و پس از سپری کردن یک روز فاز تأخیر، رشد لگاریتمی خود را آغاز می نمایند. با این وجود برتری سویه منتخب در رشد سلولی نسبت به سویه استاندارد در ۳۰ روز اول دوره گرماگذاری به وضوح قابل مشاهده بود (نمودار ۱).

نتایج حاصل از میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه بومی منتخب S_{31} و سویه استاندارد نیز نشان داد که میزان تجزیه زیستی نفت خام در خاک آلوده تا روز۳۰، توسط هر دو باکتری به حداکثر میزان خود می رسد. با این وجود سویه منتخب نسبت به سویه استاندارد از قابلیت تجزیه بیشتری برخوردار بود. اما پس از آن رشد دچار نقصان شد و از هفته ششم تلقیح، به تدریج کاهش تعداد سلول ها (نمودار ۱) و تجزیه زیستی (نمودار ۲) مشاهده گردید.

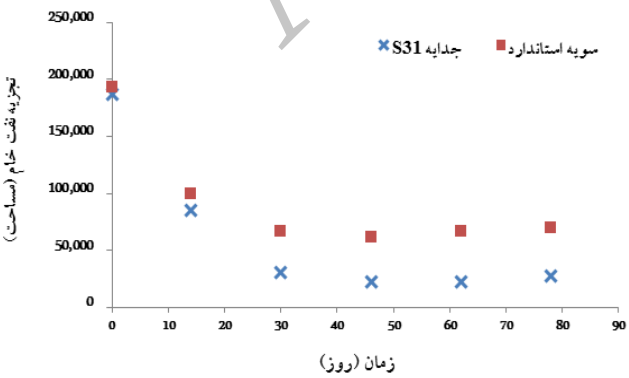
بحث

هیدروکربن های نفتی یکی از عمده ترین عوامل آلوده کننده محیط زیست هستند (۲۱). تحقیقات متعددی بر روی سودمندی و کارایی تجزیه زیستی در رفع آلودگی های محیط زیست صورت گرفته است (۷-۱). پالایشگاه های نفت در سراسر دنیا از فن آوری های مختلفی مانند روش های تیمار زیستی، شیمیایی و فیزیکی برای مدیریت آلاینده هایی که طی فرآیند پالایش و ذخیره نفت تولید می شوند، استفاده می کنند. در میان انواع روش های موجود، خنثی سازی اثرات مضر ترکیبات مورد بحث و اصلاح زیستی آن ها با استفاده از میکروارگانیسم های بومی یکی از سودمندترین روش ها به حساب آمده است (۲۲).

تکنولوژی مورد بحث دوست دار محیط بوده و نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی زدایش نفت از نظر هزینه، اقتصادی تر گزارش شده است (۲۳). به این منظور در تحقیق حاضر، جداسازی سویه های بومی نفت خوار از خاک آلوده به نفت خام منطقه کارون-۳ اهواز جداسازی و از نظر تجزیه



نمودار ۱: شمارش سلول های جدایه بومی S31 و سویه استاندارد از نمونه خاک در مدت زمان ۹۰ روز.



نمودار ۲: سنجش میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط جدایه بومی S31 و سویه استاندارد از نمونه خاک در مدت ۹۰ روز با استفاده از گاز کروماتوگرافی (مساحت زیر منحنی).

Archive of SID
www.SID.ir

زیستی غلظت ۲ درصد نفت خام منطقه در خاک، مورد بررسی قرار گرفت. در تجزیه زیستی عوامل زنده و غیرزنده متعددی دخالت دارند. به همین دلیل انجام موفقیت آمیز پاکسازی مناطق آلوده، به ویژه خاک آلوده به نفت خام، نیاز به پژوهش های متعددی دارد (۲).

نفت خام برای بسیاری از میکروارگانیسم ها سمی است. با این وجود، باکتری هایی وجود دارند که سالیان زیادی در شرایط و تنش های موجود در محیط آلوده به نفت زندگی کرده و با آن سازش پیدا کرده اند (۲۳ و ۲۰). بروجمانس (Brooijmans) و همکاران در سال ۲۰۰۹ سویه ای از *باسیلوس سوبتیلیس* را جداسازی نمودند که توانایی تجزیه هیدروکربن های n–هگزادکان و نفتالن را به ترتیب به میزان ۹۸ و ۷۵ درصد داشتند (۲٤).

چیکر (Chikere) و همکاران در سال ۲۰۱۲ تجزیه میکروبی هیدروکربن های نفت ناحیه گرمسیری آلوده به نفت را در لاگوس نیجریه مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه جدایه های متعددی از جمله سویه باکتریایی *باسیلوس سوبتیلیس* با توانایی تجزیه هیدروکربن های نفت خام (TPH) جداسازی گردید (۲۵). همچنین توانایی تجزیه سوخت دیزل به وسیله سویه ای از *باسیلوس سوبتیلیس* (۲٦)، *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus* JBL) و *اسینتوباکتر کالکواستیکوس* (*Acinetobacter calcoaceticus* LT1) (۲۹–۲۷) به اثبات رسیده است.

در مطالعه ای که توسط ونگسا (Wongsa) و همکاران در سال ۲۰۰٤ انجام شد تعداد ۵۷ جدایه تجزیه کننده نفت از خاک های آلوده به نفت جداسازی شد. در این میان چند باکتری از جنس *باسیلوس* برای مطالعه بیشتر، بر اساس کارایی مصرف نفت خام انتخاب گردید (۳۰). با توجه به پتانسیل آنزیمی بالای باکتری های بومی در شرایط زیست محیطی سخت، خاک های آلوده به نفت برای جداسازی باکتری های مورد نظر انتخاب شدند. در پژوهش حاضر ٤٤ جدایه بومی نفت خوار از خاک منطقه آلوده به نفت کارون–۳ جداسازی گردید. این جدایه ها توانایی خوبی در تجزیه هیدروکربن های نفت خام از خود نشان دادند. پس از بررسی های بیوشیمیایی و مولکولی جدایه مورد نظر (S_{31}) به عنوان *باسیلوس لیکنی فورمیس* گزارش گردید.

مواد غذایی به ویژه نیتروژن، فسفر و در برخی موارد آهن نقش بسیار مهمی در تجزیه زیستی آلوده کننده های هیدروکربنی دارند. برخی از این مواد غذایی فاکتور محدود کننده خواهند بود. از این رو فرایند تجزیه زیستی را تحت تاثیر قرار می دهند. زمانی که میزان آلودگی محیط (خاک یا آب) با نفت زیاد باشد، تأمین منبع کربن مورد نیاز رشد میکروارگانیسم ها به طور قابل توجهی افزایش می یابد.

با این وجود در چنین شرایطی، عدم دسترسی به ترکیبات نیتروژن دار و فسفردار به عنوان یک عامل محدود کننده برای تجزیه نفت به حساب می آید. از این رو، افزودن مواد غذایی جهت تجزیه زیستی آلوده کننده های نفت امری اجتناب ناپذیر و لازم است تا به واسطه آن فرایند زیست پالایی به نحو احسن انجام گیرد. با این وجود، غلظت های بیش از حد مواد غذایی نیز، می تواند از فعالیت تجزیه زیستی جلوگیری به عمل آورند (۲۰ و ۲۸).

بررسی ها نشان می دهد که در روزهای آغازین، دامنه رشد میکروارگانیسم های تجزیه کننده هیدروکربن های نفت محدود می باشد. این موضوع به اثرات اکوسیستم و شرایط محیطی مربوط می شود (۱ و ۲۹). ونگسا و همکاران نشان دادند که جمعیت باکتریایی هتروتروف تجزیه کننده نفت در تیمارهای غذایی افزایش قابل ملاحظه ای پیدا می کند. به طوری که تعداد میکروارگانیسم های مورد آزمایش پس از تیمار غذایی، از ٦×١٠^{٣} unit $g^{-١}$ در نمونه خاک کنترل، به حدود ٢×١٠^{١٠} unit $g^{-١}$ رسید و جمعیت میکروبی دو تیمار در پنج هفته بیشتر از ده هفته افزایش یافت (۳۰).

این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر هم خوانی دارد. نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که میزان جمعیت میکروارگانیسم های تحت آزمایش در بازه زمانی مشخصی که در این جا حدود روز ۳۰ بود با شدت و توان بالا تکثیر یافته و با گذشت زمان آزمایش از روز ۳۰، میزان افزایش جمعیت

Archive of SID

www.SID.ir

روندی نسبتاً کند و یا کاهشی را در پیش گرفته بود. این امر می تواند به دلیل کم شدن منابع غذایی پس از روز ۳۰ باشد. با این وجود، در مقایسه بین جدایه بومی و سویه استاندارد، برتری جدایه بومی در روند رشد تحت شرایط یکسان، کاملاً مشهود بود. تغییرات رشد جدایه بومی برتر (S_{31}) با میزان تجزیه نفت خام موجود در محیط مورد آزمایش، همخوانی داشت.

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی نشان دهنده افزایش میزان تجزیه بیولوژیک هیدروکربن های نفتی به میزان ۸٤ درصد طی یک ماه بود. در صورتی که در زمان و شرایطی یکسان، تنها ٦٥ درصد از کل هیدروکربن های موجود در نمونه خاک توسط سویه استاندارد مورد تجزیه زیستی قرار گرفت. این نتایج نشان دهنده برتری تجزیه زیستی نفت خام توسط میکروارگانیسم های بومی خاک با شرط حفظ و کنترل منابع کربن، نیتروژن و اکسیژن خاک می باشد. این امر خود باعث زیست پالایی بهتر خاک آلوده به نفت توسط میکروارگانیسم های بومی می شود.

از آن جایی که اکسیداسیون یا هیدرولیز هیدروکربن ها توسط میکروب ها صورت می گیرد، هر عامل مؤثر بر رشد و فعالیت میکروبی می تواند در میزان تجزیه زیستی و کارایی آن تأثیرگذار باشد. همچنین، پارامترهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی در فرایند تجزیه نقش مهمی ایفا می کنند. در میان عوامل فیزیکی، حرارت نقش مؤثری در تجزیه زیستی هیدروکربن ها دارد (۲ و ۳).

در مطالعه ای که توسط سینگ (Singh) و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، برای خاک های تیمار شده با سطح بالایی از مواد غذایی، به ویژه با نسبت C:N:P ۱:۱۰:۱۰۰ میزان تجزیه در حد قابل قبولی به دست آمد. در خاک کود داده شده، در مقایسه با خاکی که روی آن هیچ تیماری انجام نشده بود، به سرعت جمعیت باکتریایی تجزیه کننده هیدروکربن در ۳۰ روز اول افزایش یافته بود (۲۸).

در مطالعه حاضر نیز غنی سازی خاک با منابع C:N:P در نسبت های ۱:۱۰:۱۰۰ انجام شد. در چنین شرایطی جدایه S_{31} در بازه زمانی معادل ۳۰ روز فعالیت نفت خواری بهتری را نسبت به سویه استاندارد از خود نشان داد. کروم (Chorom) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که میزان تجزیه نفت خام با افزایش زمان، کاهش می یابد (۳۱). به طوری که این فرایند با نتایج رشد باکتری ها نیز مطابقت داشت. بیش ترین رشد باکتری ها بعد از گذشت حدود ٦ هفته مشاهده شد. از آن جایی که پس از این مدت زمان، میزان مواد غذایی آلی به سرعت کاهش می یابد، فعالیت باکتری ها و بنابراین کاهش میزان تجزیه نفت قابل انتظار است. در تحقیقی دیگر، مقدم (Moghadam) و همکاران در سال ۲۰۱٤ مشاهدات مشابهی مبنی بر افزایش جمعیت باکتریایی تجزیه کننده هیدرو کربن ها، به سرعت در طول ۳۰ روز اول از ۱۵۰ روز دوره آزمون، گزارش نمودند. آن ها دریافتند که این موضوع می تواند به عنوان یک معرف برای مشاهده زیست پالایی خاک های آلوده به نفت در نظر گرفته شود. اما با افزایش زمان، به دلیل وجود ترکیبات مقاوم زنجیره بلند در نفت و کمبود مواد غذایی، رشد باکتری ها و تجزیه نفت کاهش می یابد (۳۲).

مشاهدات ما نیز در تحقیق حاضر تایید کننده نتایج کروم و همکاران بود. به نحوی که بیش ترین میزان و سرعت رشد، به همراه بیش ترین سرعت تجزیه هیدروکربن های نفتی در محدوده روز ۳۰ دیده شد. در این رابطه با گذشت زمان، کاهش عملکرد میکروارگانیسم های مورد آزمایش کاملاً مشهود بود.

در مطالعه حاضر، با استفاده از روش های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مشخص گردید که جدایه برتر با ۱۰۰ درصد قرابت فیلوژنتیکی به جنس *باسیلوس لیکنی فورمیس* تعلق دارد. مطابق آنچه که در بررسی کینتیک رشد جدایه ها به دست آمد، جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* نسبت به سویه استاندارد در شرایط آزمایش، کاراتر می باشد. میزان تجزیه زیستی نفت خام نیز به ترتیب برای جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* و *باسیلوس مگاتریوم* (سویه استاندارد مورد استفاده) در شرایط استریل، به ترتیب برابر با ٦٥/۲۳ و ٤٨/۹٥ درصد به دست آمد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر جدایه بومی

Archive of SID

www.SID.ir

باسیلوس لیکنی فورمیس سویه ای توانمند در تجزیه زیستی ۲ درصد نفت خام در محیط خاک می باشد. استفاده از این در فرآیند تجزیه زیستی با استفاده از اجتماع (کنسرسیوم) باکتریایی در مطالعات آینده پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کارکنان آزمایشگاه های واحد تحقیقات، شیمی و میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Tabari K, Tabari M. Biodegradation potential of hydrocarbons by bacterial diversity in soil. Iran J Environ Health Sci Eng. 2010; 7(4): 319-326.

2. Tanee FBG, Albert E. Reconnaissance assessment of long-term effects of crude oil spill on soil chemical properties and plant composition at Kwawa, Ogoni, Nigeria. J Environ Sci Technol. 2015; 8(6):320-329.

3. Peng R, Xiong A, Sue Y, Fu X, Gao F, Zhao W, Tian Y, Yao Q. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol Rev. 2008; 32:927–955.

4. Xiong S, Li X, Chen J, Zhao L, Zhang H, Zhang X. Crude oil degradation by bacterial consortia under four different redox and temperature conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99(3):1451-1461.

5. Rodríguez DM, Andrade RFS, Ribeiro DLR, Rubio-Ribeaux D, Lima RA, Araújo HWC, Campos-Takaki GM. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. Int J Curr Microbiol App Sci. 2015; 4(7): 550-562.

6. Elmahdi AM, Abdul Aziz H, El-Gendy NS, Abu Amr SS, Nassar HN. Optimization of Libyan crude oil biodegradation by using solid waste date as a natural low-cost material. J Biorem Biodeg. 2014; 5:252-262.

7. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. Biotech Res Int. 2011; 6:1-13.

8. Wang Q, Zhang S, Li Y, Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. J Env Protec. 2011; 2:47-55.

9. Brooijmans RJW, Pastink MI, Siezen RJ. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Microbial Biotech. 2009; 2(6):587–594.

10. Chikere CB, Okpokwasili GC. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment. Nigeria. Biotech. 2012; 2:53–66.

11. Yu S, Li S, Tang Y, Wu X. Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. J Env Sci. 2011; 23(9):1533–1543.

12. Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B. Evaluation of inoculums addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Appl Environ Microbiol.2001; 67(4): 1675-1681.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, Mancini G, Hassanshahian M, Genovese L, Giuliano L, Yakimov MM. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. Braz J Microbiol. 2015; 46(2):377-387.

14. Agarry SE, Aremu MO, Aworanti OA. Kinetic modeling and half-life study on enhanced soil bioremediation of Bonny light crude oil amended with crop and animal-derived organic wastes. J Pet Environ Biotech. 2013; 4(2):137-147.

15. Atlas RM. Hand book of Media for Environmental Microbiology. 2nd ed. New York. Taylor & Francis; 2005.

16. Prescott LM, Harley JP. Laboratory exercises in Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill Publishers; 2001.

17. Arutchelvi M, Arkatkar A, Doble M, Bhaduri S, Uppara P. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. India J Biotech. 2008; 8: 9-22.

18. CameronG, Rood D. Total petroleum hydrocarbon analysis by capillary gas chromatography: decreasing analysis times using small-diameter columns. J Chromato Sci. 1999; 37: 1-28.

19. Korenblum E, Seldin L. Shifts in alkaline-degrading bacteria genotypes during bioremediation of a vegetated coastal soil. World J Microbiol Biotech. 2009; 25:1667-1675.

20. Korenblum E, Seldin L. Shifts in alkane-degrading bacteria genotypes during bioremediation of a vegetated coastal soil. World J Microbiol Biotech. 2009; 25: 1667–1675.

21. Tabatabaee MS, Mazaheri Assadi M. Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus*. J Environ Health Sci Eng. 2013; 11:18-29.

22. Sathishkumar M, Binupriya AR, Baik SH, Yun, SE. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. Clean.2008; 36(1): 92-96.

23. Wang Q, Zhang S, Li Y, Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. J Environ Protec. 2011; 2:47-55.

24. Brooijmans RJW, Pastink MI, SiezenRJ. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Micro Biotech. 2009; 2(6):587–594.

25. Chikere CB, Okpokwasili, GC. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. Biotech. 2012; 2:53–66.

26. Adebusoye SA, Ilori MO, Amund OO, Teniola OD, Olatope SO. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. World J Microbiol Biotech. 2007; 23 (8):1149–1159.

27. Kebria Y, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A, Amoozegar MA. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. Int J Environ Sci Tech. 2009; 6(3): 435-442.

28. Singh C, Lin J. Bioaugmentation efficiency of diesel degradation by *Bacillus pumilus* JLB and *Acinetobacter calcoaceticus* LT1 in contaminated soils. Afr J Biotech. 2010; 9(41):6881-6888.

29. Kumar A, Bisht BS, Joshi VD, DhewaT. Review on bioremediation of polluted environment: amanagement tool. Int J Environ Sci. 2011; 1(6):13-27.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Wongsa P, Tanaka M, Ueno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I, Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high Efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil and lubricating oil. Curr Microbiol. 2004; 49: 415-422.

31. Chorom M, Sharifi HS, Motamedi H. Bioremediation of a crude oil-polluted soil by application of fertilizers. Iran J Environ Health Sci Eng. 2010; 7(4): 319-326.

32. Moghadam MS, Ebrahimipour G, Abtahi B, Ghassempour A, Seyed Hashtroudi M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. J Environ Health Sci Eng. 2014;12:114-124.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 3, September 2016

Original Article

Isolation and phylogenetic analysis of indigenous oil-degrading bacteria from soil of Karoon area in Ahvaz

Mohammad Hossein Arash Assadirad[1], Mahnaz Mazaheri Assadi[2], Hamid Rashedi[3], Taher Nejadsattari[4]

[1]Ph.D., Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Tehran University, Tehran, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Bioremediation is the promising technology for the treatment of the contaminated sites since it is cost-effective and will lead to complete mineralization. This study was aimed to isolation and phylogenetic identification of indigenous oil-degrading bacteria from soil of Karoon area in Ahvaz.

Materials & Methods: The crude oil contaminated soil of Karoon area in Ahvaz was sampled accidentally and under sterile condition. The amount of absorbable phosphorus was determined using Olson method and also, carbon, hydrogen and nitrogen by CHN meter device. Mineral salt medium containing 2% crude oil was used for isolation of oil eating bacteria. Following sieving the soil samples, the total carbon content of the soils were analysed by gas chromatography. Biochemical tests and PCR method were used to identify the dominant bacteria.

Results: In this study, 44 bacterial strains were isolated, among them 20 isolates in the first and one in the second screening methods were selected, which was nominated as $S_{31.}$ This strain belonged to *Bacillus licheniformis.* The growth of the selected isolate in the media with 2% crude oil was better than the standard strain and remediated 84% of the crude oil in 30 days incubation time at about 30^{o} C.

Conclusion: The selected *Bacillus* could use 2% of crude oil as source of carbon and energy and we suggest further studies on this bacterium in bacterial consortia.

Keywords: Bioremediation, Crude oil, Gas Chromatography, Soil bacteria.

Correspondence to: Mahnaz Mazaheri Assadi
Tel: +98 9126869345
E-mail: a_assadirad@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(3): 236-246.

Archive of SID
www.SID.ir