فصلنامه علوم محیطی، دوره پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶

۱۴۰-۱۲۹

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک پالایشگاه تبریز

زهرا علی پور اسدآبادی *[۱]، منصوره ملکیان[۱]، محسن سلیمانی[۱] و حسین میردامادیان[۲]

[۱] گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد فلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲

علی پور اسدآبادی، ز.، ملکیان، م.، سلیمانی، م. و ح. میردامادیان. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی از خاک پالایشگاه تبریز. فصلنامه علوم محیطی. ۱۵(۲): ۱۴۲-۱۲۹.

سابقه و هدف: طیف گسترده‌ای از مواد آلی شیمیایی عمداً یا سهواً وارد محیط زیست می‌شوند که نگرانی‌های عمومی را پدید می‌آورند. هیدروکربن‌های نفتی از شایع‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی هستند که نشت‌شان به اکوسیستم‌های دریایی و خشکی به‌عنوان یک خطر بزرگ مطرح است. هم اکنون برای بازسازی مکان‌های آلوده، به فناوری‌های باصرفه اقتصادی نیاز است. یکی از روش‌هایی که در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته زیست‌پالایی است. در این روش از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان برای رفع، حذف یا تثبیت مواد آلاینده استفاده می‌شود. روش بیولوژیک نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است. این بررسی برای شناسایی و تعیین بهترین باکتری تجزیه‌کننده مواد هیدروکربن نفتی در خاک پالایشگاه تبریز انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی خاک‌های آلوده به مواد نفتی از پالایشگاه تبریز جمع‌آوری و برای شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از محیط سنتزی پایه نمکی بوشنل هاس (BHMS) استفاده شد. پس از مرحله غنی‌سازی، از محیط کشت جداسازی و خالص‌سازی شدند. از بین سویه‌هایی که در محیط کشت حاوی نفت خام رشد بیشتری داشتند، دو سویه برای شناسایی انتخاب شد. شناسایی مقدماتی سویه‌های جداشده بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، هوازی یا بی‌هوازی بودن، شکل کلونی و ویژگی‌های میکروسکوپی انجام گرفت. سویه‌های انتخاب‌شده به روش مولکولی با استخراج DNA و توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. میزان رشد باکتری‌ها در دیزل سبک، دیزل سنگین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. برای بررسی تولید بیورسورفکتانت از آزمون‌های گسترش نفت خام، انهدام قطره، فعالیت آمیزندگی و سنجش آب‌گریزی سطح سلولی استفاده شد.

نتایج وبحث: مقایسه توالی به‌دست‌آمده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک‌های اطلاعاتی NCBI Database Project, Ribosomal و Eztaxon نشان داد که سویه‌های موجود با ۹۸ درصد قرابت به باکتری‌های Achromobacter spanius و Pseudomonace aeruginosa تعلق داشتند.

* Corresponding Author. *E-mail Address*: Z.aliporasadabad@na.iut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

هر دو باکتری به ترتیب بیشترین رشد را در دیزل سنگین، دیزل سبک و نفت خام نشان دادند. اما باکتری A. spanius در هر سه مواد نفتی نسبت به باکتری P. aeruginosa رشد بیشتری داشت. باکتری A. spanius توانست ۶۷ درصد دیزل سبک را در مدت نه روز تجزیه کند. مثبت بودن آزمون‌های گسترش نفت خام و انهدام قطره نشان داد که باکتری‌های شناسایی‌شده مولد بیوسورفکتانت هستند. با توجه به اعداد به‌دست‌آمده، باکتری A. spanius که بهترین رشد در مواد هیدروکربنی را داشت، دارای بالاترین ضریب هیدروفوبیسته سطح سلولی و فعالیت آمیزندگی نسبت به باکتری P. aeruginosa نیز بود.

نتیجه‌گیری: A. spanius به‌عنوان باکتری کارآمدتر برای تجزیه هر سه مواد نفتی (دیزل سنگین، دیزل سبک و نفت خام) معرفی می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، بررسی پتانسیل باکتری‌های شناسایی شده در محیط‌های آبی و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی برای پاک‌سازی این آلاینده‌ها توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، آلودگی خاک، هیدروکربن‌های نفتی، توالی‌یابی ژن 16SrRNA.

مقدمه

هیدروکربن‌های نفتی از مهمترین آلاینده‌های زیست‌محیطی هستند که نشت آنها به اکوسیستم‌های دریایی و خشکی به‌عنوان یک خطر بزرگ مطرح است. آلودگی نفتی ممکن است به‌صورت تصادفی یا طی عملیات حمل‌ونقل، پالایش و ذخیره نفت به وجود آید (Hasanshahia *et al.*, 2008; Adli *et al.*, 2013). هیدروکربن‌های نفتی دارای ترکیبات پیچیده‌ای هستند که به چهار بخش هیدروکربن‌های اشباع، آروماتیک، رزین و آسفالتین تقسیم می‌شوند (Crapez *et al.*, 2006; Hasanshahia *et al.*, 2012) که دوام و پایداری آنها در محیط بسته به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها متفاوت است. روش‌های مختلفی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی وجود دارد. روش‌های فیزیکی و شیمیایی قادر به حذف طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها هستند. اما از معایب اصلی آنها مصرف زیاد انرژی و استفاده از مواد شیمیایی است. در برخی روش‌های پاک‌سازی فیزیکی و شیمیایی مواد آلاینده حذف نمی‌شوند، بلکه از نوعی به نوع دیگر آلاینده تبدیل یا به محیط دیگری منتقل می‌شوند (Wilson and Jones, 1993) بنابراین برای تجزیه مواد آلاینده و بهسازی مکان‌های آلوده استفاده از روش‌های نوین با کمترین اثر جانبی ضروری است. یعنی استفاده از ریزجانداران و گیاهان برای کاهش، حذف یا تثبیت مواد آلاینده، روشی در حال توسعه برای برداشت، تثبیت، حذف و تجزیه بسیاری از آلاینده‌ها به‌ویژه آلاینده‌های نفتی است (Vidali *et al.*, 2001). در زیست‌پالایی فعالیت متابولیک ریزجانداران باعث تجزیه آلاینده‌ها به ترکیبات غیرسمی می‌شود. روش‌های زیستی نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر و در مناطق وسیع نیز قابل اجرا هستند. این روش‌ها حداقل تاثیر را بر محیط زیست بر جای می‌گذارد. با این وجود فرایند زیست‌پالایی فرایندی زمان‌بر است و درجه موفقیتش به pH، دما، در دسترس بودن اکسیژن و مقدار مواد مغذی مانند نیتروژن و فسفر در محیط بستگی دارد (Margareth *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 1993). از سال ۱۹۶۹ که ماگت طی گزارشی ۵۰ گونه باکتریایی فعال از ریزجانداران تجزیه‌کننده نفت خام را از آب دریا و رسوبات آلوده‌کننده به مواد نفتی جدا کرد، محققان متعددی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی را در مناطق مختلف شناسایی و معرفی کرده‌اند. این ریزجانداران توانستند نفت موجود در محیط کشت را در مدت ۶۰ ساعت تجزیه کنند و بیشتر به جنس Agrobacterium، Pseudomonas، Vibrio تعلق داشته و در بین آنها انواع Micrococcus، Bacillus ،

Archive of SID
www.SID.ir

marinobacter دیده شدند (Capellis *et al.*, 2001). جمعیت باکتریایی تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در میدان نفتی برزیل و سواحل مکزیک با استفاده از روش مولکولی و استخراج ژن 16SrRNA بررسی شد (Isaac *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Rosanohernandez *et al.*, 2012). باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای را از رسوبات جداسازی و شناسایی کردند. در این بررسی بعد از غنی‌سازی و جداسازی با استفاده از روش مولکولی جنس Pseudomonas،marinobacter، شناسایی شدند. میزان رشد این باکتری‌ها در محیط حاوی نفتالین، پیرین و فنانترین بررسی شد و نتایج نشان داد که همه باکتری‌ها قادر به رشد در هر سه ماده آروماتیک بودند (Isaac *et al.*, 2013).

شناسایی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده آلاینده‌های نفتی اولین گام برای زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به این ترکیبات است. کشور ایران یکی از ۵ کشور مهم دنیا در تولید و استحصال نفت است. طی فرایندهای استخراج، پالایش، انتقال و ذخیره نفت و فرآورده‌های آن احتمال ورود نفت به محیط وجود دارد. در سال‌های اخیر با توجه به فرسودگی لوله‌های انتقال نفت و نشت آنها، رهاسازی پساب‌ها و لجن‌های نفتی به محیط زیست و نیز فرایندهای آلوده‌کننده حین پالایش و تصفیه فرآورده‌های نفتی مشکلات زیست‌محیطی در آب و خاک به وجود آمده است.باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در خرمشهر را جداسازی و شناسایی کردند (Hassanshahian et al. 2014). بهترین باکتری شناسایی‌شده بر اساس سرعت رشد در نفت خام به گونه Corynebacterium variabile تعلق داشت. این باکتری می‌توانست در مدت یک هفته ۸۲ درصد از نفت خام را تجزیه کند (Hassanshahian *et al.*, 2014). باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از منطقه خلیج فارس، دریای خزر و پساب‌های نفتی شهر تهران و کرمان جداسازی و با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند (Hassanshahian *et al.*, 2012, 2013, 2014). Soleimani et al. (2013) باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک‌های پالایشگاه‌های تهران، اراک و اصفهان شناسایی و توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی آنها را مقایسه کردند. نتایج نشان داد که تنوع باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های مورد بررسی قابل توجه بود.

باکتری‌های شناسایی شده در خاک‌های مورد بررسی، طیف نسبتا وسیعی از جنس‌های باکتریایی مانند Bacillus، Pseudomonas، Rhodococcus را شامل می‌شدند (Soleimani *et al.*, 2013).

پالایشگاه نفت تبریز یکی از پالایشگاه‌های مهم نفت کشور است که در جنوب غرب شهر تبریز در ارتفاع ۱۳۶۲ متری از سطح دریا و در محدوده‌ای به وسعت ۱/۵ کیلومتر مربع قرار گرفته است. محصولات این پالایشگاه بنزین، گازوئیل، نفت سفید و گاز مایع است. در فرآیند پالایش مواد نفتی امکان آلودگی خاک به مواد نفتی وجود دارد. با توجه به اقلیم سرد منطقه شناسایی باکتری‌هایی که بتوانند در چنین محیطی به تجزیه ترکیبات نفتی و پاک‌سازی خاک‌های آلوده بپردازند اهمیت زیادی دارد. اما تاکنون پژوهشی در این‌باره صورت نگرفته است. هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی کارآمدترین باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی (نفت خام، دیزل سبک و دیزل سنگین) در خاک‌های آلوده پالایشگاه تبریز بود. از این باکتری‌ها می‌توان با توجه به سازگاری‌های زیست‌محیطی منطقه برای رفع آلودگی ترکیبات نفتی خاک استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری

نمونه‌برداری خاک در فصل تابستان از محوطه داخل پالایشگاه تبریز صورت گرفت. شش نمونه تصادفی

Archive of SID
www.SID.ir

مرکب، که خود ترکیبی از چهار نمونه مخلوط شده در محل نمونه‌برداری بود، از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی‌متری برداشت شد. برای نمونه‌برداری، سه سانتی‌متر خاک سطحی کنار زده شد، زیرا به علت هوازدگی سطحی امکان کاهش فعالیت و جمعیت میکربی وجود داشت. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در دمای کنترل‌شده ۴ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک به آزمایشگاه منتقل شدند Silva *et al.*, (2013).

غنی‌سازی، خالص‌سازی و جداسازی باکتری‌ها

محیط سنتزی پایه نمکی بوشنل هاس (BHMS)[1] برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام استفاده شد. ابتدا ۱۰ گرم از خاک آلوده به نفت خام به ارلن که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BHMS اضافه و به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر ۱۳۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت هر ارلن به ارلن حاوی محیط کشت جدید اضافه شد و مرحله بالا آنقدر تکرار شد تا کدورت ایجادشده توسط اضافه کردن محیط قبلی به محیط جدید که ناشی از ذرات خاک بود از بین برود و محیط جدید در اثر رشد باکتری‌ها کدر شود. از آخرین محیط کشت فرایند غنی‌سازی رقت‌های مختلفی تهیه و روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی نفت خام به روش خطی کشت داده شد. محیط کشت آماده‌شده برای کشت باکتری شامل ۲۳ گرم در لیتر نوترینت آگار (NA) بود که بعد از اضافه کردن به آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو قرار داده شد تا کاملاً استریل شود. سپس بر اساس رنگ و شکل کلونی باکتری‌ها در محیط کشت NA انتخاب و در نهایت خالص‌سازی شدند (Hassanshahian *et al.*, 2014).

شناسایی بهترین باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت

محیط کشت پایه معدنی نفت مطابق با روش ارائه‌شده (۱۰۰ میلی‌لیتر در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری) تهیه و با استفاده از دستگاه اتوکلاو استریل شد. نفت خام به میزان ۱ درصد محیط کشت و یک لوپ باکتری‌ها خالص‌سازی‌شده به محیط کشت استریل‌شده اضافه شد. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور یخچال‌دار در دمای ۳۰ درجه و ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت دو هفته قرار داده شد. هر ۴۸ ساعت میزان رشد باکتری‌ها با اسپکتروفتومتر (UV-VIS) مدل JASCO/N-530 در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. باکتری‌هایی که دارای بالاترین رشد در نفت خام بودند برای شناسایی انتخاب شدند (Hassanshahian *et al.*, 2013).

شناسایی باکتری‌های جداشده

شناسایی مقدماتی سویه‌های جداشده بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، هوازی یا بی‌هوازی بودن، شکل کلونی و ویژگی‌های میکروسکوپی انجام گرفت . استخراج DNA ژنومی از باکتری کشت‌داده‌شده با استفاده از کیت DNeasy Blood and Tissue Handbook شرکت Qiagen انجام شد. برای تکثیر ژن 16S rRNA از پرایمرهای اختصاصی ژن . 27f: 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'، 1541r: 5- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3' استفاده شد. واکنش PCR با شرایط دمایی سه دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد ارزیابی شد. برای خالص‌سازی محصول PCR از کیتQiaquic PCR purifacation استفاده شد. بعد از خالص‌سازی الکتروفورز انجام شد که وجود قطعه ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی را تایید کرد. محصولات خالص واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دستگاه ABI 3730XL DNA Analyzer توالی‌یابی شدند. توالی به‌دست‌آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک‌های اطلاعاتی Ribosomal Database Project ,NCBIو Eztaxon مقایسه شد که با

Archive of SID
www.SID.ir

درنظر گرفتن قرابت بالاتر از ۹۸ درصد، جنس و گونه باکتری شناسایی شد (Adli *et al.*, 2013).

سنجش ر شد و حذف نفت خام، دیزل سنگین و دیزل سبک

منحنی رشد ایزوله‌ها به طور غیرمستقیم با اندازه‌گیری کدورت به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر UV-(VIS) مدلJASCO/N-530 در طول موج ۵۶۰ نانومتر تهیه شد. یک درصد محیط کشت دیزل سبک اضافه شد. میزان حذف دیزل سبک با حل کردن مقدار دیزل سبک باقی‌مانده محیط کشت در n هگزان و سپس خواندن کدورت دیزل سبک استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد Hassanshahian *et al.*, 2013).

تعیین توان تولید بیو سورفکتانت‌ها به و سیله باکتری‌ها

برای تعیین بیوسورفکتانت‌ها از روش تست فروپاشی قطره، گسترش نفت خام و آزمون‌های تکمیلی مانند سنجش آب‌گریزی سطح سلولی و فعالیت آمیزندگی استفاده شد (Hassanshahian *et al.*, 2013).

سنجش آب‌گریزی سطح سلولی[۲]

ابتدا سوسپانسیون میکربی در بافر تهیه شد. ترکیبات بافر در هر لیتر به شرح زیر بود: ۲۲گرم فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۲۲ گرم فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم، ۷/۲۶ گرم اوره، ۲ گرم سولفات منیزیم. سپس ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکربن دیزل سبک به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. مخلوط حاصل پس از دو دقیقه همزنی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا فاز هیدروکربنی جدا شود. نتایج به صورت درصد فاز آبی پس از تیمار نسبت به جذب اولیه سوسپانسیون باکتریایی، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-VIS) مدل JASCO/N-530 در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد Hassanshahian (*et al.*, 2013, 2014).

فعالیت آمیزندگی [۳]

باکتری‌های تجزیه‌کننده ابتدا در محیط مارین براث کشت داده شدند. پس از رسیدن به رشد لگاریتمی، ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت به لوله آزمایش حاوی ۶ میلی‌لیتر نفت سفید استریل اضافه و با سرعت بالا مخلوط شد. ترکیب حاصل به مدت ۲۴ ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شد. سپس فعالیت آمیزندگی محاسبه شد (Hassanshahian *et al.*, 2013, 2014).

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام

در این بررسی ۱۰ سویه باکتریایی تجزیه‌کننده نفت خام از خاک‌های آلوده پالایشگاه جداسازی شد. سویه‌هایی که دارای بیشترین رشد در نفت خام بودند برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند.

باکتری‌های شناسایی‌شده

مقایسه توالی به‌دست‌آمده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک‌های اطلاعاتی NCBI, Ribosomal Database Project و Eztaxon نشان داد با. قرابت بالاتر از ۹۸ درصد سویه‌های موجود به گونه‌های spanius Achromobacter و Pseudomonace aeruginosa تعلق دارد که با کدهای KY635400 KY635407 در NCBI ثبت شده‌اند (فایل کدهای ژنتیکی ضمیمه شده است).

مشخصات گونه‌های باکتری‌های شناسایی شده

باکتری Achromobacter spanius

این باکتری گرم‌منفی، باسیل و کروی شکل به رنگ

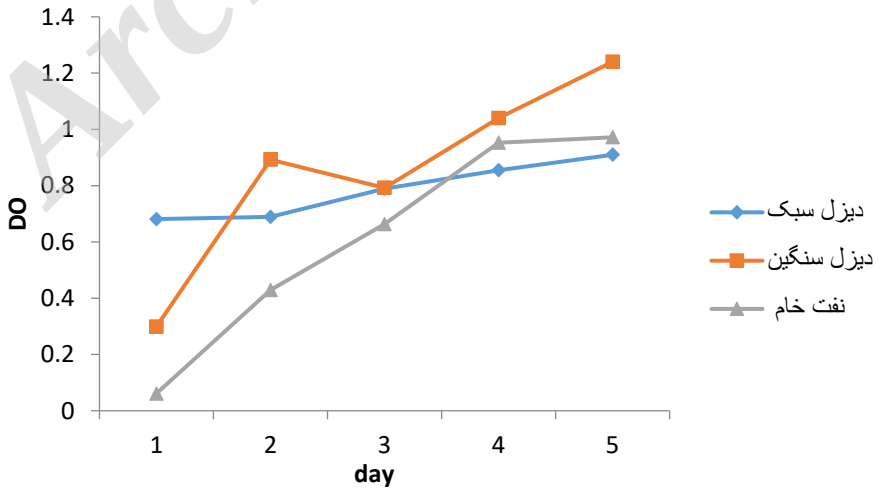
Archive of SID
www.SID.ir

خاکستری است که در دمای ۳۰ درجه در مدت ۴۸ ساعت رشد می‌کند و اندازه کلونی آن کمتر از یک میلی‌متر است. برخی از ویژگی‌های این باکتری در جدول ۱ آمده است. نمودار رشد باکتری A. spanius در سه ماده هیدروکربنی نفت خام، دیزل سنگین و دیزل سبک در شکل ۱ نشان داده شده است. روند رشد باکتری در دیزل سبک با شیب و نوسان کمتری نسبت به رشد در نفت خام و دیزل سنگین بود. همچنین با افزایش زمان رشد باکتری‌ها در هر سه محیط افزایش نشان داد که بیانگر سازگاری باکتری با هر سه محیط کشت است.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی و زیستی باکتری Achromobacter spanius

Table1. Chemical and biological properties of bacteria Achromobacter spanius

نتیجه Result	آزمون Test	نتیجه Result	آزمون Test
-	Voges Proskauer	+	رشد روی آگار Grow in agar
-	Methy red	+	اکسیداز Oxidase
-	ایندول Indole	+	کاتالاز Catalase
+	Simmons citrate	Non Fermentative	OF
+	حرکت Motility	+	Nitrate reduction to nitrite
-	Hydrogen sulfide (H_2S)	-	Nitrate reduction to N2
-	Beta- Galactosidase (ONPG)	Alk/Alk	KIA
-	Gelatin hydrolysis	-	Esculin Hydrolysis
-	اوره‌آز	-	Arginine dihydrolase
-	DNase at 25°C	-	Lysine decarobxylase
-	Acid from glucose	-	Ornithine decarboxylase



شکل۱ - رشد باکتری Achromobacter spanius در ترکیبات مختلف نفتی بر اساس جذب نوری در طول موج ۴۸۰

Fig. 1- Achromobacter spanius bacterial growth in various combinations of oil based on light absorption at a wavelength of 480

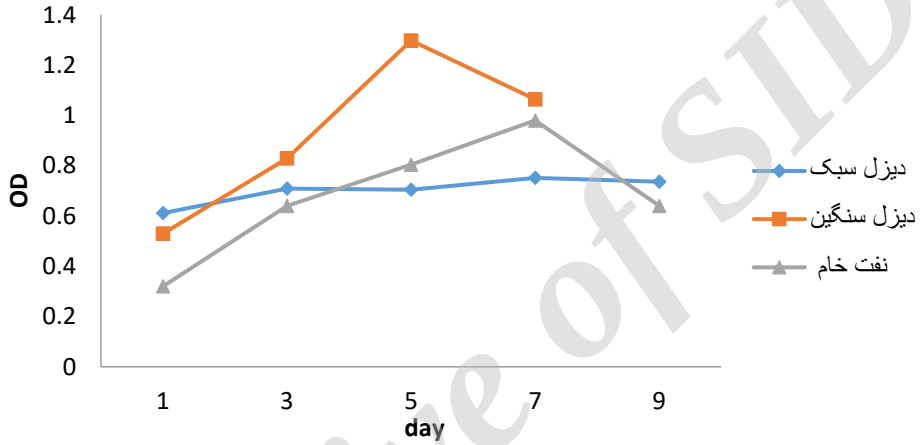
Archive of SID
www.SID.ir

باکتری Pseudomonas aeruginosa

باکتری گرم‌منفی کوکوباسیل که اندازه کلونی‌اش بین ۱-۲ میلی‌متر است. در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت رشد می‌کند. برخی ویژگی‌های این باکتری در جدول ۲ آمده است. باکتری سودموناس از بین سه ماده هیدروکربنی، بیشترین رشد را در دیزل سنگین و کمترین رشد را در دیزل سبک نشان داد (شکل ۲). احتمالاً این باکتری سازگاری بیشتری برای رشد در محیط حاوی دیزل سنگین نسبت به سایر ترکیبات مورد بررسی داشته است.

بررسی و مقایسه بیوسورفکتانت باکتری‌های شناسایی شده

مثبت بودن آزمون‌های گسترش نفت خام و انهدام قطره نشان داد که باکتری‌های شناسایی‌شده مولد بیوسورفکتانت هستند (جدول ۳) که برای بررسی کامل‌تر آزمون‌های سطح هیدروفوبیسته سطح سلولی، ضریب و آمیزندگی انجام شد.



شکل ۲ – رشد باکتری (جذب یا OD) Pseudomonas aeruginosa در ترکیبات نفتی مختلف بر اساس جذب نوری در طول موج ۴۸۰

Fig. 2- Bacteria (or absorption (OD Pseudomonas aeruginosa in petroleum compounds based on optical absorption at a wavelength of 480

جدول ۲ – برخی ویژگی‌های باکتری Pseudomonas aeruginosa

Table 2. Some properties of the bacteria Pseudomonas aeruginosa

نتیجه Result	آزمون Test	نتیجه Result	آزمون Test
+	Pyocyanin	+	رشد روی آگار Growth on MacConkey agar
–	Voges Proskauer	+	اکسیداز Oxidase
–	متیل رد Methy red	+	کاتالاز Catalase
–	ایندول Indole	Oxidative	OF
+	Simmons citrate	+	Nitrate reduction to nitrite
+	حرکت	–	Nitrate reduction to N2
–	Hydrogen sulfide (H_2S)	Alk/Alk	KIA
–	Beta- Galactosidase (ONPG)	–	Esculin Hydrolysis
+	Gelatin hydrolysis	+	Arginine dihydrolase
–	اوره‌آز	–	Lysine decarobxylase
–	DNase at 25°C	–	Ornithine decarboxylase
+	Acid from glucose	+	Pyoverdin

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه آزمون‌های مختلف برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت

Table 3. Comparison of different tests to detect biosurfactant-producing bacteria

تست باکتری bactri*	تست فروه پاشی قطره * Drop collapse method	تست گسترش نفت خام** Oil spreading method	بررسی هیدروفوبیسته سطح سلولی Cell surface hydrophobicity	ضریب امیزندگی Emulsification activity	میزان حذف دیزل سبک(٪) Rate removal Light diesel
Achromobacter spanius	++	19/33	34/12	7	67
Pseudomonas aeruginosa	+++	12	30	5	50/50

*:پخش جزیی محیط کشت روی نفت

**:اندازه قطر هاله شفاف ایجادشده روی نفت که نشان‌دهنده توان تولید بیوسورفکتانت بر حسب میلی‌متر

بررسی سنجش آب‌گریز بودن سلولی و فعالیت آمیزندگی

آب‌گریز بودن سطح سلولی به اتصال باکتری‌ها به ترکیبات هیدروکربنی (هیدروفوب) کمک می‌کند. از این رو سویه‌هایی که درصد بالاتری از این ویژگی‌ها را داشته باشند در تجزیه زیستی موثرتر هستند. در این بررسی آکروموباکتر اسپانیوس دارای بالاترین هیدروفوبیسیته بود.

فعالیت آمیزندگی

باکتری‌هایی که قادر به تولید امولسیون بیشتری باشند به دلیل دسترسی به منبع انرژی بیشتر، قابلیت تجزیه بیشتری نیز خواهند داشت. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در این بررسی سویه A. spanius بالاترین فعالیت آمیزندگی را داشت. با توجه به اعداد به‌دست‌آمده باکتری A. spanius که دارای بهترین رشد در مواد هیدروکربنی بود، هیدروفوبیسته سلولی و فعالیت امولسیون بالاتری هم داشت

نتیجه‌گیری

باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد هیدروکربنی نفتی از پالایشگاه تبریز جداسازی و شناسایی شدند. باکتری‌های جداسازی‌شده به دو گونه *Achromobacter spanius* و *Pseudomonas aeruginosa* تعلق داشتند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده هر دو باکتری شناسایی‌شده قادر به تجزیه مواد هیدروکربنی نفتی بودند اما با توجه به داده‌های رشد و تولید بیوسورفکتانت‌ها باکتری *A. spanius* نسبت به *P. aeruginosa* برای تجزیه مواد نفتی کارایی بیشتری داشت. این باکتری توانست درمدت ۹ روز ۶۷ درصد دیزل سبک را تجزیه کند. نتایج این تحقیق را می‌توان با یک مدیریت صحیح برای کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده به کار برد، هرچند در فرایندهای زیست‌پالایی استفاده از مجموعه‌ای از باکتری‌های تجزیه‌کننده با توانایی تجزیه ترکیبات مختلف توصیه می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود رشد این باکتری با توجه به فاکتورهای مختلف بررسی و امکان استفاده از برنامه‌های پالایش خاک از جمله زیست‌پالایی در این مناطق مورد بررسی قرار گیرد.

پی‌نوشت‌ها

[1] Bushnell Hass Mineral Salt
[2] Cell surface hydrophobicity
[3] Emulsification activity

منابع

Adli, M., Hassanshahian, M. and Krimi Niki, A., 2013. Isolation, identification and characterization of two species of Shyvanlay biosurfactant-producing Persian Gulf. Joranl. Microbes World. 6, 53-61. (In Persian with English abstract).

Archive of SID
www.SID.ir

Cheng Deng, M., Li, J., Rui Liang, F., Yi, M., Ming Xu, X., Ping Yuan, J., Peng, J. and Fei Wu, C., 2014. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. Marine Pollution Journal. 83, 79-86

Crapez, M. and Wasserman, J., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. Research in Microbiology Jornal. 157, 752–762.

CapelliS, M., Busalmen, J. and Sanchez, S., 2001. "Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by Indiagenous bacteria". International Biodeterioration and Biodegradation.. 4, 233-23

Hasanshahian, M. and Emtiazi , G., 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation Jornal. 62, 170–178.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G. and Cappello , S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin Jornal. 64, 7-12.

Hassanshahian , M., Ahmadinejad, M. Tebyanian, H. and Kariminik , A., 2013. Isolation and chracterization of alkan degrding bacteria from peteroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provinances). Marin Pollution Bulletine Jornal. 73, 300-305.

Hassanshahian, M., Zeynalipour, M. and Musa, F., 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provinnce). Marine Pollution Bulletin Jornal. 82, 39-44.

Hassanshahian, M., 2013. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). Marine Pollution Bulletin Jornal. 86, 361-366.

Isaac , P., Sánchez , L., Bourguignon, N., Eugenia Cabral, M. and Ferrero, M., 2013. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. International Biodeterioration and Biodegradation Jornal. 82, 207-214

Kumaria, B., Singha ,S. and Singhb, P., 2012. Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. Process Biochemistry Journal. 47, 2463–2471.

Liu, H., Yao, J., Yuan, Z., Shang, Y , Chen, H., Wang, F. and Masakorala , K., 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from oil water mixture in Dagang oil field China. International Biodeterioration and Biodegradation Jornal. 87, 52-59

Margareth, E., Guyoneaud, R., Marisol Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M . and Wasserman, J., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. Research in Microbiology Jornal. 157, 752–762.

Rosanohernandez , M., Sadd , H. and linares, L., 2012. Petroleum-influenced beach sediment of the cameche bank mexico: Diversityand bacterial community structure assessment. Journal of Environmental anagement Journal. 95, 325-331.

Archive of SID
www.SID.ir

Silva, T., Verde, L., Santos Neto, E. and Oliveira, V., 2013. Diversity analyses of microbial communities in petroleum sample from Brazilian oil field. International Biodeterioration and Biodegradation Jornal. 81, 57-70.

Soleimani , M., Farhoudi, M. and Christensen, J., 2013. Chemometric assessment of enhanced bioremediation of oil contaminated soils. Journal of Hazardous Materials Jornal. 254, 372– 381

Shah alyan , F., Safahiyh, A., salamat, N., Mojodi, F. and Zareh Dost, M., 2014. Check growth and production of biosurfactants two species Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida in Moses cove. Journal of Aquatic Ecology. 5, 51-59.(In Persian with English abstract).

Tebyanian , H. Hassanshahian , M. Kariminik, A.2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). Journalm of Microbes World. 4, 105-114. (In Persian with English abstract).

Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry Jornal. 73, 1163–1172.

Wilson , S. and Jones, K., 1993. Bioremedation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). Environmental Polluation Jornal. 81, 229-249.

Archive of SID

www.SID.ir

Environmental Sciences Vol.15 / No.2 / Summer 2017

129-140

Isolation and molecular identification of hydrocarbon-degrading bacteria from soil around Tabriz refinery

Zahra Alipour Asadabadi[1*], Mansoureh Malekian[1], Mohsen Soleimani[1] and Hossein Mirdamadian[2]

[1] Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Isfahan University of Falavajan, Isfahan, Iran

Received: 2016.06.30 **Accepted:** 2017.06.23

Alipor Asadabadi, Z., Malekian, M., Soleimani, M. and Mirdamadian, H., 2017. Isolation andmolecular identification of hydrocarbon-degrading bacteria from soil around Tabriz refinery. Environmental Sciences. 15(2): 129-142.

Introduction: A wide range of organic chemicals enter into the environment, intentionally or unintentionally, creating public concern. Petroleum hydrocarbons represent one of these organic pollutants threatening various hazards to terrestrial and marine ecosystems. We need cost effective technologies for restoration of contaminated sites, and bioremediation is one the methods which has been used in recent decades. In this method, microrganisms and plants are used to remove, degrade or stabilize pollutants. Biological methods are economically more acceptable than physical and chemical methods. The current study aims to identify the best bacteria for decomposing petroleum hydrocarbons in the soil at Tabriz refinery.

Materials and methods: In this study, oil contaminated soils were collected from a refinery in Tabriz and, in order to identify them, a synthetic Bushnell Haas Mineral Salts medium (BHMS) was used. After the enrichment process, separation and purification were performed. Two strains were selected for molecular identification based on the higher growth in a medium containing crude oil. Molecular identification of the selected strains was conducted after DNA extraction and sequencing of the 16S rRNA gene. The growth of bacteria in both light and heavy diesel was recorded using a spectrophotometer at wavelengths of 560 nm. To assess the production of a biosurfactant, several tests including a drop collapsing test, oil displacement test as well as emulsification activity and cell surface hydrophobicity were performed.

Results and discussion: The sequences obtained were compared with those of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The isolated bacteria with 98% similarity belonged to *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter spanius*. Both bacteria showed growth in all the three oil components, however,

* Corresponding Author. *E-mail Address*: Z.aliporasadabad@na.iut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Achromobacter spanius had higher growth rate compared to *Pseudomonas aeruginosa*. The latter could decompose 67 percent of light diesel in 9 days. Although both bacteria could produce a biosurfactant, *Achromobacter spanius* had higher hydrophobic cell surface and emulsification activity.

Conclusion: In the current study we introduced *Achromobacter spanius* as an efficient bacterium for the decomposition of heavy and light diesel and crude oil. Based on the results, it is recomended that the ability of the identified bacteria in petroleum contaminated terrestrial and aquatic environments be investigated further.

Keywords: Bioremediation, Soil pollution, Petroleum hydrocarbons, 16SrRNA gene.

Archive of SID

www.SID.ir