

بررسی فاکتورهای مؤثر بر بقاء و فعالیت باکتریهای تجزیه‌کننده نفت در فرآیند

زیست‌پالایی



سوما نریمانی، عیدی بازگیر* و حسین میرزایی نجفقلی

لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵

چکیده

مرکز انتقال نفت شهدای تنگ فنی شهرستان پلدختر یکی از مراکز مهم انتقال نفت است که فرسودگی خطوط انتقالی سبب آلودگی خاک و آب این منطقه شده است. با توجه به ضرورت تحقیقات جهت زیست‌پالایی در این منطقه، گونه‌های باکتریایی از نواحی آلوده جداسازی و شناسایی شدند. هدف از این پژوهش بررسی فاکتورهای مؤثر بر بقاء و برازش باکتریهای تجزیه‌کننده نفت است. در این پژوهش از باکتریهای *Acinetobacter junii*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Stenotrophomonas acidaminiphila* و *Sphingobacterium multivorum* جداسازی شده از خاک و آب آلوده به نفت منطقه پلدختر استفاده گردید. ابتدا حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نفت بر این باکتریها به روش ماکرودیولوشن بر حسب میکرولیتر بر میلی لیتر نفت سفید تعیین گردید. سپس گونه‌های باکتری از نظر فاکتورهای توانایی تشکیل ساختارهای بیوفیلم، تولید سیدروفور، توانایی انحلال فسفات و تولید ایندول استیک اسید مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند. گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Comamonas koreensis* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تحمل به نفت را نشان دادند. همچنین گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور و تشکیل ساختار بیوفیلم باکتریایی را نشان داد. در آزمون انحلال فسفات گونه‌های *Acinetobacter junii* و *Acinetobacter baumannii* بیشترین توانایی در انحلال فسفات را دارا بودند. همچنین گونه *Sphingobacterium multivorum* بیشترین میزان ایندول استیک اسید را تولید نمود. با توجه به توانایی این گونه‌های باکتریایی در تحمل آلودگیهای نفتی و دارا بودن فاکتورهای تقویت‌کنندگی رشد گیاه می‌توان آنها را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده در پدیده زیست-پالایی خاکهای آلوده پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری، زیست‌پالایی، بیوفیلم، ایندول استیک اسید.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۷۴۲۵۸۶۹، پست الکترونیکی: Mirzaeih89@gmail.com

مقدمه

دارند، مورد توجه می‌باشند. هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای گروه بزرگی از ترکیبات آلی با دو یا چند حلقه آروماتیک هستند. این ترکیبات نسبتاً خنثی با حلالیت کم در آب، چربی دوست و بسیاری از آنها در فشار کم بخار می‌شوند (۲۳). این ترکیبات حاصلخیزی، نفوذپذیری، ظرفیت نگهداری آب و ظرفیت اتصال خاک را کاهش

فرآورده‌های نفتی یکی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای امروز هستند و به عنوان تهدیدی جدی برای محیط زیست محسوب می‌گردند. این مواد در حین تولید، انتقال، استفاده نامناسب و نشت، سبب آلودگی خاک می‌شوند (۳۷). از بین ترکیبات نفتی، هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) به علت پایداری بالا در محیط و اثرات مضر که بر سلامت انسان

Flavobacterium Micrococcus Agrobacterium
Erobacter Achromobacter Burkholderia Erwinia
 و *Delftia* توانایی انحلال فسفات را دارند (۲۲).

در این پژوهش از باکتریهای *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter baumannii*، *Acinetobacter junii*، *Sphingobacterium Delftia tsuruhatensis* و *Stenotrophomonas acidaminiphila multivorum* و *Comamonas koreensis* جداسازی شده از خاک و آب آلوده به نفت منطقه تنگ فنی پلدختر استفاده گردید (۵). هدف از این مطالعه تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت از رشد گونه‌های باکتریایی و بررسی فاکتورهای مؤثر بر بقاء و فعالیت این باکتریها مانند تشکیل بیوفیلم، انحلال فسفات، سیدروفور و تولید ایندول استیک اسید به عنوان تجزیه‌کنندگان نفت و افزایش دهنده رشد گیاه می‌باشد.

مواد و روشها

تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت بر رشد گونه‌های باکتریایی: به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت (Minimum Inhibitory Concentration) از رشد گونه‌های باکتریایی از محیط-کشت NB (Nutrient Broth) حاوی رفتهای ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۴۲۵، ۴۵۰، ۴۷۵، ۵۰۰، ۵۲۵، ۵۵۰، ۵۷۵ و ۶۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر نفت سفید استفاده شد. ابتدا جمعیت 10^8 CFU/ml گونه‌های باکتریایی تهیه و مقدار ۲۵ میکرولیتر به درون میکروتیوبهای ۲ میلی‌لیتری حاوی ۹۷۵ میکرولیتر از رفتهای ذکر شده، اضافه گردید. میکروتیوبها به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۷۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین میزان ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه درون پتری NA کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه درون

می‌دهند، به طوری که امکان دارد خاک غیرقابل استفاده شود (۶ و ۱۹).

روشهای متعدد فیزیکی، شیمیایی، زیستی و گیاهی پالایی (Phytoremediation) برای اصلاح خاکهای آلوده وجود دارد، اما با توجه به هزینه بالا و عوارض جانبی روشهای فیزیکی-شیمیایی، استفاده از روشهای زیستی در اولویت قرار گرفته است (۳۱). در طول چند دهه گذشته، تجزیه زیستی آلاینده‌های (Bioremediation) خاکهای آلوده به عنوان یک موضوع مهم در پژوهشهای زیست محیطی مطرح بوده و بسیاری از راهکارهای تجزیه زیستی، برای کاهش آلودگی این خاکها بهبود یافته اند (۳۷). فناوری زیست پالایی بر پایه استفاده از ریزجانداران طبیعی موجود و یا ریزجانداران ایجاد شده به وسیله مهندسی ژنتیک به منظور احیای مجدد مکانهای آلوده و حفاظت از محیط زیست استوار است. کاربرد موفق تجزیه زیستی، وابسته به شناسایی و جداسازی سویه‌های میکروبی مناسب است که توانایی تجزیه آلاینده‌ها را دارند (۲۴).

ناحیه ریزوسفر، زیستگاه بسیار کوچک و پویایی را برای ریزجانداران خاک فراهم می‌آورد که در آن، ریزجانداران مرتبط با ریشه گیاه، اجتماعی منحصر به فرد با پتانسیل قابل ملاحظه برای سم‌زدایی از ترکیبات زائد سمی را تشکیل می‌دهند. برخی از باکتریهای افزایش دهنده رشد گیاه، دارای توانایی فوق‌العاده‌ای جهت بهبود رشد گیاه میزبان از طریق مکانیسمهای مختلف مانند تولید سیدروفور، ایندول استیک اسید و انحلال فسفات می‌باشند. همچنین این باکتریها برای کاهش آلاینده‌های خاک و معدنی کردن ترکیبات آلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۰ و ۲۲). اسپتکن (Esitken) و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۹ نقش هورمونهای گیاهی را در واکنش گیاهان نسبت به تنشهای زیستی و غیرزیستی نشان داده‌اند.

با توجه به پژوهشهای انجام شده سویه‌های باکتریایی متعلق به جنسهای *Rhizobium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*

انکوباتور نگهداری شدند. حداقل غلظت کشنده (minimum bactericidal concentration) براساس عدم رشد بر روی محیط‌کشت NA تعیین گردید (۱۴ و ۲۵).

بررسی توانایی گونه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم:
جهت بررسی کمی و کیفی تشکیل بیوفیلم از روش میکروپلیت الیزا استفاده گردید. ابتدا از کشت ۲۴ ساعته گونه‌های باکتریایی، جمعیت CFU/ml 10^{10} تهیه گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌کشت Luria Bertani broth (merck) درون چاهکهای پلیت الیزا ریخته شد، سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون گونه‌های باکتریایی به درون هر چاهک حاوی محیط‌کشت اضافه و به مدت ۲۴ ساعت و ۵۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، پلیت با آب مقطر سترون شست و شو داده شد. بعد از خشک شدن چاهکهای پلیت، میزان ۱۲۵ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۱ درصد به هر کدام از چاهکها اضافه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، مجدداً پلیت با آب مقطر سترون شست و شو داده شد. سپس توسط میکروسکوپ نوری تشکیل ساختارهای بیوفیلم از لحاظ کیفی بررسی شد. همچنین برای سنجش نیمه کمی بیوفیلم ۱۲۵ میکرولیتر از محلول اسید استیک ۳۰ درصد به هر کدام از چاهکها اضافه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج سنجش نیمه کمی توسط نرم افزار SAS ver.9.2 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (۱۶).

بررسی میزان انحلال فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی: به منظور بررسی کیفی انحلال فسفات توسط گونه‌های باکتریایی از محیط‌کشت اسپربر-آگار (Sperber Agar merck) استفاده گردید. ابتدا گونه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای در مرکز تشتکهای پتری حاوی محیط-کشت اسپربر-آگار کشت گردید و به مدت هفت روز در

دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگهداری شد. ایجاد هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری نمایانگر فعالیت حل‌کنندگی فسفات معدنی می‌باشد. همچنین به منظور تخمین کمی توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌ها، از محیط-کشت اسپربر مایع استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون CFU/ml 10^9 از گونه‌های دارای توانایی انحلال فسفات تهیه شد و میزان ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون از هر جدایه باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت اسپربر مایع اضافه و به مدت ۵ روز روی شیکر با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سلولهای باکتری رسوب داده شد و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه، شدت جذب نوری هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد و مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (۳۴). محلولهای استاندارد فسفر در غلظتهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۳۵ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شده و با استفاده از معادله $y = 52.955x + 0.0181$ غلظت فسفر مشخص گردید.

بررسی تولید سیدروفور توسط باکتریها: به منظور ارزیابی کیفی تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی از آزمون کروم آزورول-سولفونات (CAS) آگار استفاده شد (۳۳). پس از تهیه محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون CFU/ml 10^8 هر باکتری به روش قطره‌گذاری در مرکز تشتک پتری قرار داده شد و سپس تشتکهای پتری به مدت ۵ روز و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تغییر رنگ محیط کشت از آبی تیره به نارنجی روشن (زرد)، نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی بود. همچنین به منظور مقایسه میزان تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی از آزمون CAS شاتل (CAS-Shuttle)

استفاده شد. سپس مقدار ضریب جذب هر گونه باکتریایی در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید (۹).

زمینه‌ای در نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های باکتریایی یکسان باشد (۳۵).

بررسی تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط باکتریها: بررسی تولید ایندول استیک اسید توسط گونه‌های باکتریایی، بر اساس روش گلیک‌من و دساکس (۱۹۹۵) تعیین گردید. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 CFU/ml از گونه‌های باکتری به محیط کشت دورکین و فاستر (DF) حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال-تریپتوفان (L-Tryptophan) تلقیح گردید. بعد از رسوب سلولهای باکتریایی توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۱۰۰۰ دور بر دقیقه، مقدار یک میلی‌لیتر از مایع رویی به دو میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی اضافه و ورتکس گردید (۱۲). گسترش رنگ صورتی بعد از ۲۵ دقیقه نشان‌دهنده تولید IAA توسط گونه‌های باکتریایی بود (۳۲). میزان تولید IAA توسط هر جدایه باکتری از طریق اندازه‌گیری میزان جذب محلول در طول موج ۵۳۵ نانومتر و مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (۱۲). محلولهای استاندارد IAA در غلظتهای ppm ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ تهیه شده و با استفاده از معادله این منحنی ($y = 34.18x + 0.53$) غلظت IAA در نمونه‌های مجهول محاسبه شد. قابل ذکر است که برای تهیه محلولهای استاندارد IAA به جای آب مقطر از محیط کشت دورکین و فاستر (DF) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان استفاده گردید تا ماده

طرح آزمایشی و تحلیل نتایج: تمامی آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در هر تیمار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت پذیرفت. میانگینها بر پایه آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

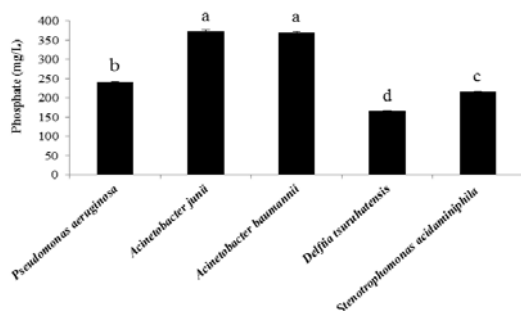
در این پژوهش از باکتریهای جدا شده از منطقه آلوده به نفت پلدختر استفاده شد و جدایه‌های باکتریایی از نظر تشکیل ساختارهای بیوفیلم، میزان تولید سیدرفور، ایندول استیک اسید و انحلال فسفات مورد بررسی قرار گرفتند. بافت خاک منطقه از نوع لومی‌شنی و میزان ماده آلی آن ۱,۴۴۳ درصد محاسبه گردید.

حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت بر گونه‌های باکتری: با مقایسه میانگینها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین میزان تحمل به ترکیبات نفتی را دارا بود و گونه *Comamonas koreensis* کمترین میزان تحمل به ترکیبات نفتی را نشان داد. سایر نتایج حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نفت از رشد گونه‌های باکتری

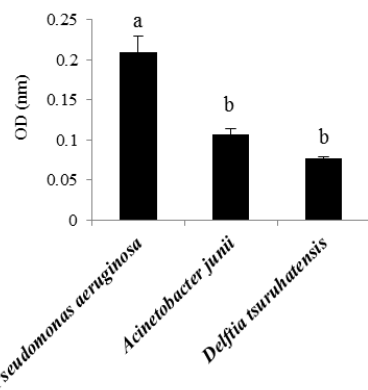
گونه‌های باکتریایی	حداقل غلظت بازدارندگی (میکرولیتر بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میکرولیتر بر میلی لیتر)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۵۷۵	۶۰۰
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	۴۰۰	۴۲۵
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	۴۰۰	۴۵۰
<i>Comamonas koreensis</i>	۴۰۰	۴۷۵
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	۵۵۰	۵۷۵
<i>Acinetobacter baumannii</i>	۵۰۰	۵۲۵
<i>Acinetobacter junii</i>	۵۵۰	۵۷۵

تولید سیدروفور را دارا بودند.



نمودار ۲- مقایسه توانایی گونه‌های باکتریایی در انحلال فسفات (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Delftia tsuruhatensis* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تولید سیدروفور را از خود نشان دادند (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی در طول موج ۶۳۰ نانومتر

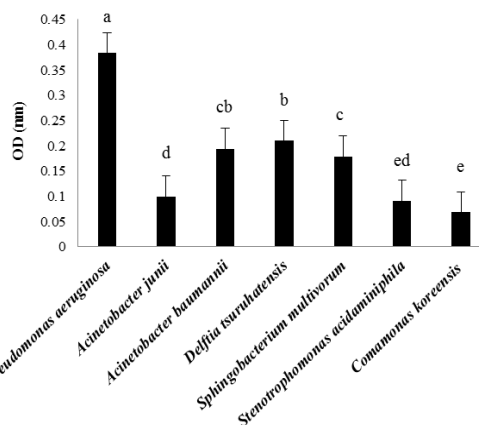
بررسی میزان تولید ایندول استیک اسید: تمامی گونه‌های باکتریایی توانایی تولید میزان ایندول استیک اسید را داشتند (نمودار ۴). گونه‌های باکتری *Sphingobacterium multivorum* و *Comamonas koreensis* به ترتیب با مقدار میانگین ۳/۰۹ و ۰/۷۴ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین و کمترین میزان ایندول استیک اسید را تولید کردند.

بحث

در این پژوهش از باکتری‌های جداسازی شده از مناطق نفتی

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم:

با مقایسه میانگینها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین میزان توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بود و گونه *Comamonas koreensis* کمترین میزان تشکیل بیوفیلم را نشان داد. سایر نتایج توانایی تشکیل بیوفیلم توسط گونه‌های باکتریایی در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- مقایسه توانایی گونه‌های باکتریایی در تشکیل ساختارهای بیوفیلم باکتریایی (طول موج ۵۵۰ نانومتر)

بررسی میزان انحلال فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی: ظهور هاله شفاف اطراف کلنی باکتری در محیط‌کشت حاوی فسفات معدنی نمایانگر توانایی انحلال فسفات است. باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter baumannii*، *Acinetobacter junii*، *Stenotrophomonas*، *Delftia tsuruhatensis*، *acidaminiphila* توانایی انحلال فسفات را دارا بودند (نمودار ۲). همچنین گونه‌های *Acinetobacter junii*، *Acinetobacter baumannii* به ترتیب با تولید ۳/۳۷۴ و ۳۶۹/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفات توانایی بیشتری در انحلال فسفات داشتند.

بررسی میزان تولید سیدروفور توسط جدایه‌های

باکتریایی: گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa*،

Acinetobacter junii و *Delftia tsuruhatensis* توانایی

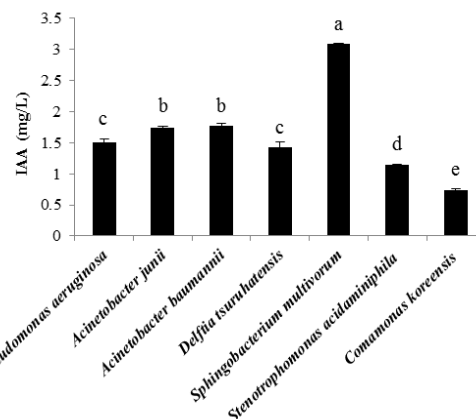
پلدختر استفاده گردید (۵).

فرآیند، میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتریها از طریق سیستم آنزیمی آلاینده‌ها را به محصولات بی‌ضرر تبدیل می‌کنند (۲۶ و ۳۰).

در بررسی حداقل غلظت بازدارنده و کشنده نفت بر علیه باکتریهای، گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین میزان تحمل به ترکیبات نفتی را دارا بود. در این پژوهش گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین تحمل و راندمان حذف نفت را از خود نشان داد، که با پژوهش محسن زاده و همکاران (۱۳۹۱) مطابقت داشت (۴). با مقایسه میانگینها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه

Pseudomonas aeruginosa بیشترین میزان توانایی تشکیل بیوفیلم را دارا بود. بیوفیلم در باکتریهای تجزیه‌کننده نفت به عنوان یک سد فیزیکی برای جلوگیری از ورود هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای به درون غشاء عمل می‌کند (۳۶). همچنین ساختارهای بیوفیلم باکتریایی سبب مقاومت در برابر مواد مضر مانند ترکیبات فنولی می‌شود و پس از گذشت مدت زمانی باکتری توانایی مصرف و تجزیه آنها را پیدا می‌کند (۳). بنابراین بالا بودن قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط گونه‌های *Delftia tsuruhatensis* و *Pseudomonas aeruginosa* می‌تواند سبب سهولت استقرار این گونه‌ها در محیطهای تحت تنش شود.

از دیگر فاکتورهایی که سبب بهبود رشد و استقرار بهتر گیاهان در محیطهای آلوده به تنش می‌شود، قابلیت تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی کلونیزه کننده ریشه می‌باشد. تولید سیدروفور توسط گونه‌های باکتریایی *Pseudomonas aeruginosa*، *Acinetobacter junii* و *Delftia tsuruhatensis* توسط محققین مختلف مانند بوپاتی (Boopathi) و راوو، بویسن (Buysens) و همکاران، دوغاری (Doughari) و همکاران، هان (Han) و همکاران، طهماسبی و همکاران و صغیرخان (Saghir Khan) و همکاران گزارش شده است (۱، ۸، ۱۰، ۱۳ و ۲۱). باکتریها به منظور تأمین آهن مورد نیاز خود، در شرایط



نمودار ۴- مقایسه توانایی گونه‌های باکتریایی در تولید ایندول استیک اسید (میلی‌گرم بر لیتر)

فاکتورهای حداقل غلظت بازدارنده و کشنده، میزان توانایی گونه‌ها در تشکیل بیوفیلم، تولید ایندول استیک اسید، انحلال فسفات و تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفت. که گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین توانایی در تشکیل بیوفیلم و تولید سیدروفور را دارا بود. همچنین تمامی گونه‌ها توانایی تولید ایندول استیک اسید را دارا بودند.

پیشرفت سریع تکنولوژی در مواردی سبب آلودگی منابع طبیعی و محیط زیست گردیده است. خاک به عنوان یکی از اجزای مهم محیط زیست، دریافت کننده آلاینده‌های مختلف مانند هیدروکربنهای نفتی، پسماندهای صنعتی و کشاورزی است. با وجود انعطاف پذیری ذاتی، به علت استفاده و مدیریت نادرست، خاک مستعد تخریب و کاهش کیفیت است. در نتیجه آلودگیهای خاک به عنوان یک مانع عمده در توسعه پایدار مطرح است (۳۰). از مهم‌ترین اثرات مضر این ترکیبات در خاک می‌توان به کاهش حاصلخیزی خاک، ظرفیت نگهداری آب، نفوذپذیری و ظرفیت اتصال خاک اشاره کرد (۶). در طول چند دهه گذشته، زیست‌پالایی خاکهای آلوده یک موضوع مهم در پژوهشهای زیست‌محیطی می‌باشد (۳۷). برای تاثیر این

طریق تحریک تقسیم سلولی و طولیل شدن سلولها، سبب ارتقای رشد ریشه گیاه تحت شرایط تنش‌زا گردند (۱۷).

نتیجه‌گیری

باکتریهای مورد استفاده در این پژوهش تواناییهای مختلفی مانند توانایی ایجاد ساختارهای بیوفیلم باکتریایی و تولید سیدروفور برای افزایش بقاء و فعالیت در شرایط تنش را از خود نشان دادند. در بین گونه‌های باکتریایی، گونه *Pseudomonas aeruginosa* بیشترین توانایی در تولید سیدروفور و تشکیل بیوفیلم از خود نشان داد. همچنین با توجه به توانایی بالای گونه‌های مورد استفاده در انحلال فسفات و تولید ایندول استیک اسید می‌توان این گونه‌ها را به عنوان ارتقاء دهندگان رشد و سازگاری گیاهان در شرایط تنش معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه لرستان به دلیل فراهم نمودن امکانات و تجهیزات کمال تشکر و قدردانی را دارند.

کمبود آهن سیدروفور تولید می‌کنند (۲). همچنین باکتریها محرک رشد گیاه برای کاهش سمیت آلاینده‌ها در گیاهان، با تولید سیدروفور آهن را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (۱۱ و ۱۸).

همه باکتریها قابلیت تولید ایندول استیک اسید را دارا بودند. در پژوهش حاضر نیز تمامی گونه‌های باکتریایی مورد استفاده توانایی تولید ایندول استیک اسید را دارا بودند. ایندول استیک اسید، وظایف متنوعی را در رشد و نمو گیاهان بر عهده دارد و در شکل‌دهی به ساختمان ریشه گیاه، تمایز بافتهای آوندی، تنظیم نمو ریشه‌های جانبی، قرارگیری قطبی تارهای کشنده و جاذبه‌گرایی ریشه نقش دارد (۷). همچنین IAA به عنوان یک مولکول سیگنال در باکتریها عمل می‌کند و به طور مستقیم بر فیزیولوژی باکتریها تأثیرگذار است (۲۹). بر اساس برآوردهای صورت گرفته حدود ۸۰ درصد از باکتریهای خاک از توانایی ترشح هورمون گیاهی ایندول-۳-استیک اسید برخوردار هستند (۲۷ و ۲۸). برخی از ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه به واسطه سنتز هورمون گیاهی ایندول استیک اسید قادرند از

منابع

- ۱- طهماسبی، ف. لکزبان، ا. خاوازی، ک. و پاکدین پاریزی، ع. ۱۳۹۳. جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید سیدروفور در باکتریهای سودوموناس و تأثیر آن بر رشد ذرت در محیط آبکشت. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۷ (۱): ۷۵-۸۷.
- ۲- رسولی صدقیانی، م. خاوازی، ک. رحیمیان، ح. ملکوتی، م. ج و اسدی رحمانی، هادی. ۱۳۸۵. ارزیابی توان سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریز و سفر گندم برای تولید سیدروفور. مجله علوم خاک و آب، جلد ۲۰ (۱): ۱۳۳-۱۴۳.
- ۳- فرزاد کیا، م. رضایی کلاتری، ر. موسوی، س. غ. جرفی، س و غلامی، م. ۱۳۸۸. تصفیه فاضلاب مصنوعی حاوی پروپیلن lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. Ann. Bot. 97: 883-893.
- ۴- Boopathi E, Rao KS. 1999. A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. Biochim. Biophys. Acta. 1435(1): 30-40.
- ۵- نریمانی، س. بازگیر، ع. و میرزایی نجفقلی، ح. ۱۳۹۳. شناسایی باکتریهای تجزیه‌کننده نفت از مناطق آلوده پلدختر و بررسی فاکتورهای مؤثر بر کارایی تجزیه در آنها. مجله فناوری زیستی در کشاورزی. جلد ۱۳ (۲): ۱۱-۱۹.
- 6- Alam Khan J, Rizvi SHA. 2011. Isolation and characterization of microorganism from oil contaminated sites. Adv Appl Sci Res. 2(3): 455-460.
- 7- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation,

- 9- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3663-3668.
- 10- Buysens S, Heungens K, Poppe J, Hofte M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (3): 865-871.
- 11- Crowley D, Wang Y, Reid C, Szaniszló PJ. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil.* 130 (1-2): 179-198.
- 12- Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.* 40: 74-84.
- 13- Doughari H J, Ndakidemi P A, Human I S, Benade S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ.* 26 (2): 101-112.
- 14- Erriu M, Pili FMG, Tuveri E, Pigiampo D, Scano A, Montaldo C, Piras V, Denotti G, Pilloni A, Garau V. 2013. Oil essential mouthwashes antibacterial activity against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: a comparison between antibiofilm and antiplanktonic effects. *Int. J. Paediatr. Dent.* 1-5.
- 15- Esitken A, Pirlak L, Ipek M, Donmez MF, Cakmakci R, Sahin F. 2009. Fruit bio-thinning by plant growth promoting bacteria (PGPB) in apple cvs. Golden Delicious Braeburn. *Biol. Agric. Hort.* 26: 379-390.
- 16- George A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* (47).
- 17- Glick BR, Penrose DM, Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190: 63-68.
- 18- Glick BR. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21: 383-393.
- 19- Gojic-Cvijovic GD, Milic JS, Solevic TM, Beskoski VP, Ilic MV, Djokic LS, Narancic TM, Vrvic MM. 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation.* 23: 1-14.
- 20- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412.
- 21- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 28 (1): 66-76.
- 22- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60(4): 579-598.
- 23- Kanaly R A, Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182 (8): 2059-2067.
- 24- Leoni L, Ambrosi C, Petrucca A, Visca P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth promoting *Pseudomonas B10*. *Fems Microbiol. Lett.* 208 (2): 219-225.
- 25- Moghaddam M, Alymanesh MR, Mehdizadeh L, Mirzaei H, Pirbalouti AG. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Ocimum ciliatum*, as a new source of methyl chavicol, against ten phytopathogens. *IND CROP PROD.* 59: 144-148.
- 26- Mohite BV, Jalgaonwala RE, Pawar S, Morankar A. 2010. Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Innovat. Rom. Food Biotechnol.* 7: 61-65.
- 27- Normanly J, Slovin JP, Cohen JD. 2004. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies P.J. (ed) *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action.* Kluwer, Dordrecht. 36-62.
- 28- Saghir Khan M, Zaidi A, Ahmad Wani P, Oves A. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7: 1-19.
- 29- Saharan BS, Nehra V. 2011. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review.* *LSMR.* 21: 1-30.
- 30- Sayara T, Pognani M, Sarrà M, Sánchez A. 2010. Anaerobic degradation of PAHs in soil: Impacts of concentration and amendment stability on the PAHs degradation and biogas production. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 64 (4): 286-292.
- 31- Shabir G, Afzal M, Anwar F, Tahseen R, Khalid ZM. 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61(2), 161-166.
- 32- Sheng XF, Xia JJ. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere.* 64: 1036-1042.
- 33- Silva-Stenico ME, Pacheco FTH, Rodrigues JLM, Carrilho E, Tsai SM. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol. Res.* 160: 429-436.

- 34- Sperber JI. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res. 9: 778-781.
- 35- Torres-Rubio MG, Valencia-Plata SA, Bernal-Castillo J, Martinez-Nieto P. 2000. Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp. producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores from Colombian rice rhizospher. Rev Latinoam Microbiol. 5: 171-176.
- 36- Van Hammet J D, Singh A, Ward OP. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol R. 67 (4):503-549.
- 37- Xu Y, Lu M. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. J Hazard Mater. 183: 395-401.

Evaluation of Effective Factors on Survival and Activity of Petroleum Degradation Bacteria in Bioremediation Process

Narimani S., Bazgir E. and Mirzaei Najafgholi H.

Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

Abstract

Tang Fany petroleum Pumping Station (TFOPS) of Poldokhtar is an important and the old point of oil transition. The soil and water around this site is petroleum polluted due leakage of petroleum. The purpose of this study was to evaluate effective factors for survival and fitness of the petroleum degrading bacteria. The following bacterial species were isolated and identified from petroleum polluted soil and water in TFOPS region: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter baumannii*, *Delftia tsuruhatensis*, *Comamonas Koreensis*, *Sphingobacterium multivorum* and *Stenotrophomonas acidaminiphila*. The MIC and MBC were determined relative to oil whit the macrodilution method. The bacterial species Compared and evaluated on the factors ability to form a bacterial biofilm, siderophore production, indole acetic acid and dissolve phosphate. Two species namely *P. aeruginosa* and *C. koreensis* showed the highest and the least petroleum concentration tolerance, respectively. The two species also have the highest and the least biofilm production ability, respectively. *Acinetobacter junii* and *A. baumannii* in the test of dissolution of phosphate, most were able to dissolve phosphate. *Sphingobacterium multivorum* highest produced indole acetic acid. Due to the ability of the bacterial species to tolerate oil pollution and factors to promote plant growth, it can be suggested as alternative for application in the Bioremediation of contaminated soil events.

Key words: Pollution Petroleum, Bacteria, Bioremediation, Biofilm, Indole Acetic Acid.