Archive of SID

مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از اکوسیستم جنگل‌های حرا بندر خمیر و میناب، شمال خلیج فارس

ایمان فخرزادگان، مهدی حسن شاهیان*، مجید عسکری حصنی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۰۳/۳۱
اصلاح: ۹۴/۰۶/۱۲
پذیرش: ۹۴/۰۶/۱۶

کلمات کلیدی:
آلودگی نفتی
تجزیه زیستی
باکتری
جنگل های حرا

چکیده

جنگل‌های حرا اکوسیستم های ساحلی هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر دنیا یافت می شوند. نشت نفت باعث وارد شدن صدماتی به این اکوسیستم های دریایی می شود. هدف از این تحقیق بررسی باکتری های تجزیه کننده در اکوسیستم برخی جنگل های حرا واقع در خلیج فارس بود. در این تحقیق از رسوبات، حرا و آب دریای مجاور جنگل های میناب و بندر خمیر واقع در خلیج فارس نمونه برداری به عمل آمد. باکتری‌های تجزیه کننده با روش کشت اختصاصی، غربالگری و با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. در این تحقیق ۹ جدایه باکتریایی تجزیه کننده از جنگل‌های مورد بررسی جداسازی شد. پس از کشت جدایه ها درون محیط ONR7 و ۱ درصد نفت خام ۳ جدایه BP14، NP16 و NP19 که بیشترین رشد را در نفت خام داشتند، انتخاب گردیدند. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که این جدایه ها به جنس و گونه‌های *Vibrio azureus* و *Pseudomonas salomonii* تعلق داشتند. این جدایه ها در طی ۱۵ روز بیش از نیمی از نفت را حذف نمودند. بالاترین میزان حذف نفت مربوط به جدایه NP19 با میزان ۶۶ درصد بود. با تکثیر این باکتری ها در مقیاس میدانی می توان از آن ها جهت پاکسازی اکوسیستم جنگل های حرا آلوده به نفت استفاده نمود.

مقدمــه

جنگل‌های حرا اکوسیستم‌های ساحلی هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری سراسر دنیا یافت می شوند (Kathiresan and Bingham, 2001). از نظر جغرافیایی، در قاره های آسیا، آمریکا، آفریقا و استرالیا وجود دارند. برخلاف سایر جنگل های مناطق استوایی، حراها ترکیبی از تعداد کمی گونه های درختی و درختچه ای هستند. گونه های گیاهی موجود در این جنگل ها نسبت به شرایط کمبود اکسیژن و غلظت نمک بالا سازگاری پیدا کرده اند. ترکیب پوشش گیاهی این جنگل‌ها را در درجه ی اول هیدرولوژی، جغرافیا و آب و هوای یک منطقه کنترل می کند (Schaeffer-Novelli *et al.*,2000). اگرچه این جنگل ها از نظر گونه های گیاهی فقیر هستند اما از نظر گونه های جانوری بسیار غنی بوده و جانوران ساکن در آنها شامل بندپایان، نرم تنان، دوزیستان، انواع ماهی ها، پرندگان و پستانداران می‌باشد که ممکن است همه یا بخشی از دوران حیات خود را در این اکوسیستم سپری کنند. بسیاری از جانوران در طول دوره‌ی تولید مثل و یا جهت پیدا کردن غذا وارد این جنگل‌ها می شوند؛ از این رو این اکوسیستم محل صید بسیاری از گونه‌های تجاری ماهی و میگو محسوب می‌شود (Kathiresan and Bingham, 2001).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mshahi@uk.ac.ir
hasanshahi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

این اکوسیستم با عملکرد طبیعی که دارد، از نظر اکولوژیکی و اقتصادی دارای اهمیت بالایی است. به عنوان مثال، محلی برای نوزادگاه بسیاری از ماهیان، نرمتنان، خزندگان، پرندگان و پستانداران؛ محلی برای تجمع کربن و مواد غذایی؛ محلی برای نوسازی بیومس دریایی و همچنین سدی برای محافظت سواحل در برابر امواج و طوفان می باشد (Alongi, 2002).

در ایران این جنگل‌ها در چندین منطقه در بین طول جغرافیای ´۱۱°۲۵ و ´۵۲°۲۷ قرار دارند. تنها دو گونه‌ی *Avicennia marina* و *Rhizophora mucronata* در ایران رویش دارند که گونه‌ی *Avicennia marina* گونه‌ی غالب بوده و در ۹۰٪ زیستگاه های حرا دیده می شود. همچنین گونه‌ی *Rhizophora mucronata* به صورت محدود در منطقه‌ی سیریک رویش دارد (Neinavaz *et al.*, 2012). جنگل‌های حرای ایران آخرین حد پراکنش جنگل ها در آسیای جنوب غربی به شمار می آید. پراکنش حرا در ایران از شرقی ترین بخش دریای عمان درکشور، از خلیج گواتر شروع می شود و با حرکت به غرب خلیج فارس و زیاد شدن عرض جغرافیـای در استان بوشهر پایان می یابد. به طور کلی رویشگاه‌های حرا در جنوب کشـور و در سـواحل خلـیج فـارس و دریای عمان در مناطق متعددی گسترش یافته انـد کـه سـاحل سـه اسـتان هرمزگـان، سیستان و بلوچستان و بوشهر از خلیج گواتر در سیستان و بلوچستان تا بوشهر را شامل می شود. به عبارتی از مجموع۴/۱۲ میلیون هکتار وسعت جنگل‌های ایران، تنها ۲۲ هزار هکتار آن را جنگل‌های حرا تشکیل مـی‌دهـد کـه در ایـن میـان حدود ۲۱ هزار هکتار آن فقط در استان هرمزگان واقع شده که بیشترین سطح آن با گستره هایی بـه وسـعت ۱۴هـزار هکتـار در جزیره قشم رویش دارد. تمام جنگلهای حرا در ایران به دلیل اهمیت اکولوژیکی و حساسـیت بـه آلاینـده هـا جـزو منـاطق حساس دریایی محسوب می شوند (نوری و همکاران، ۱۳۹۰).

نفت خام و برخی از فراورده های آن به عنوان یکی از مهم ترین آلاینده های زیست محیطی به حساب می آیند و نشت نفت باعث وارد شدن صدماتی به اکوسیستم های دریایی و زمینی می شود. آلودگی نفتی ممکن است به صورت تصادفی یا عملیاتی و در هنگام تولید، انتقال، ذخیره و یا فراوری کردن یا استفاده در دریا و یا خشکی روی دهد. نشت نفت به عنوان یک تهدید جدی برای اکوسیستم های ساحلی محسوب می شود (Head *et al.*, 2006; Bayat *et al.*, 2015). برخی از محققان جنگل‌های حرا را حساس‌ترین اکوسیستم ساحلی نسبت به آلودگی نفتی برمی‌شمارند (Hayes and Gundlach, 1979). تحقیقات میدانی و آزمایشگاهی نشان داده است که در اکثر موارد، نفت باعث صدمه دیدن یا مرگ حراها می شود. چگونگی آسیب و مکانیسم سمیت کمتر واضح است؛ اگر چه عموماً مشخص شده که نفت باعث خفگی فیزیکی و اثرات سمی و فیزیولوژیکی می‌شود. محققان در مورد سهم نسبی هر مکانیسم اختلاف نظر دارند، که ممکن است با نوع نفت و زمان نشت متفاوت باشد. حتی اگر یک فراورده نفتی به خودی خود سمی نباشد، زمانی که به صورت فیزیکی گیاهان و جانوران را می پوشاند، ممکن است باعث ایجاد خفگی، گرسنگی یا دخالت در دیگر عملکردهای فیزیولوژیکی معمول و مرگ جاندار شود. این اثرات فیزیکی به سازگاری فیزیولوژیکی حراها وابسته و اما مستقل از سمیت شیمیایی ذاتی نفت است. علاوه بر این مسمومیت های حاد یا مزمن ناشی از نفت می تواند اثرات فیزیکی را تشدید کنند (Proffitt, 1997; Hassanshahian *et al.*, 2013).

یکی از راه های موجود برای رفع آلودگی های نفتی تجزیه زیستی است. تجزیه زیستی فرآیندی است که طی آن عوامل زیستی از قبیل باکتری، قارچ و یا گیاه، هیدروکربن ها و ترکیبات زنوبیوتیک را طی یک سری واکنش های پیچیده به موادی ساده تر تبدیل می کنند. تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم ها فرآیند اولیه در حذف هیدروکربن ها و مواد زنوبیوتیک است. در تجزیه زیستی، باکتری ها و قارچ ها عمدتاً تجزیه هیدروکربن ها را بر عهده دارند و گیاهان وظیفه هوارسانی به خاک و رسوب و همچنین جذب و جمع آوری نمک ها و فلزات سنگین را از خاک و رسوبات بر عهده دارند. باکتری ها و قارچ ها از هیدروکربن های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی به منظور رشد استفاده می کنند و آنها را به موادی همچون اسیدها، الکل‌ها، فنل ها، هیدروپراکسیدها، ترکیبات کربونیل، استرها و در نهایت دی اکسید کربن و آب تبدیل می کنند (Eglinnton, 1975). با وجود مطالعات فراوان بر روی اکوسیستم حرا، در مورد تجزیه زیستی نفت خام در این اکوسیستم مطالعات نسبتاً کمی صورت گرفته است (Brito *et al.*, 2006). Ramsay و همکاران (۲۰۰۰)، تعداد زیاد و متنوعی از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی را در رسوبات حرای کشور استرالیا گزارش کردند. Bayoumi و El-Nagar (۲۰۰۹)، سویه های *Bacillus*

www.SID.ir

Archive of SID

Bacillus polymyxa و *subtilis, Bacillus licheniformis, Pseudomonas pseudomallei* را به عنوان سویه های برتر تولیدکننده بیوسورفاکتانت تجزیه کننده نفت خام، از جنگل های حرای دریای سرخ جداسازی نمودند. در ایران Kafilzadeh و همکاران (2013a) سویه‌های باکتریایی برتر تجزیه کننده برخی از هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای همانند، Phenanthrene و Fluoranthene را از رسوبات حرا منطقه نایبند جداسازی کردند.

همانطور که گفته شد اکوسیستم جنگل های حرا، یکی از مهمترین و حساس ترین اکوسیستم های ساحلی در برابر آلاینده ها به ویژه نفت خام است. همچنین با توجه به آلودگی نفتی وسیع نفت خام در خلیج فارس و آسیب گسترده حراها در نتیجه آلودگی های نفتی، نقش میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری ها برای تجزیه زیستی این اکوسیستم بسیار اهمیت دارد و می توان از آنها برای احیا زیستی این اکوسیستم استفاده نمود. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده نفت خام از جنگل های حرا میناب و بندر خمیر و همچنین بررسی کارآیی تجزیه زیستی باکتری های جداسازی شده بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، نمونه های رسوب از کنار درخت حرا، آب دریا و نمونه های گیاهی شامل برگ و ریشه های هوایی (به منظور جداسازی باکتری های سطحی نمونه های گیاهی)، از جنگل های حرای بندر خمیر (۲۶ درجه شمالی و ۵۴ درجه شرقی) و میناب (۳۷ درجه شمالی و ۴۹ درجه شرقی) جمع آوری شدند (شکل ۱). نمونه رسوبات با استفاده از چاقوی استریل از عمق ۱۲cm-۰، نمونه آب دریا از عمق ۵ cm و نمونه های گیاهی نیز با چاقوی استریل از حراهای این مناطق مختلف جمع آوری و در ظروف استریل و در ظرف یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا انجام آنالیزهای بعدی قرار داده شدند (Bayoumi and El- Nagar, 2009).

شکل ۱. جنگل‌های حرا میناب و بندر خمیر که با علامت مثلث مشخص شده اند

جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده نفت

برای جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط کشت اختصاصی ONR با ۱٪ نفت خام استفاده شد. جهت غنی سازی اولیه، ۱۰میلی لیتر از نمونه‌های آب، ۱۰ گرم از رسوبات و ۱۰ گرم محلول گیاهی به داخل این محیط تلقیح شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰°C قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته میزان ۵ میلی لیتر از این محیط برداشته و به محیط جدید تلقیح شد. پس از گذاشتن در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰°C به مدت یک هفته، رقت 10^{-4} از محیط تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت مارین آگار انتقال داده شد. پس از ۴۸ ساعت، کلنی‌های منحصر به فرد از هر محیط کشت انتخاب و روی محیط کشت مارین آگار جدید جهت تهیه کلنی خالص کشت خطی داده شد (Hassanshahian *et al*., 2014).

www.SID.ir

Archive of SID

تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی

فعالیت امولسیون کنندگی از طریق اضافه کردن ۴ میلی لیتر باکتری در محیط براث به ۶ میلی لیتر نفت سفید بررسی شد. به این صورت که مخلوط نفت سفید وکشت باکتری ۲ دقیقه درون لوله آزمایش ورتکس شدند و سپس به مدت ۲۴ساعت به صورت ساکن در دمای محیط قرار داده شدند. درصد امولسیون براساس فرمول زیر محاسبه گردید (Maneerat and Kulnaree, 2007).

$$E24 = \frac{\text{ارتفاع ناحیه امولسیون شده}}{\text{کل ارتفاع مایع}} \times 100$$

به منظور بررسی میزان هیدروفوبیسیته سطح سلولی از روشی که قبلاً توسط Pruthi و Cameotra (۱۹۹۷)، توضیح داده شده بود، استفاده شد.

بررسی میزان رشد و حذف نفت خام

سویه های باکتریایی برتر جداسازی شده از مراحل قبل، درون ارلن حاوی محیط ONR7a حاوی ۱ درصد نفت به مدت ۱۰ روز بر روی انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ °C گرمخانه گذاری شدند. پس از آن میزان OD_{600} سویه ها برای بررسی میزان رشد در مقایسه با شاهد بررسی شد. در این تحقیق برای بررسی میزان حذف نفت خام از دو روش استفاده گردید. به این صورت که ابتدا نفت باقیمانده درون ارلن با حلال آلی دی کلرومتان استخراج شد و سپس میزان OD_{420} آن در مقایسه با شاهد مورد بررسی قرار گرفت. روش دوم که برای بررسی میزان حذف نفت خام استفاده شد روش FTIR بود. این روش به عنوان روشی پرقدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیای به کار می رود. همچنین این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی به کار می‌رود زیرا طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک های ماکسیمم و مینیمم دارند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ایی به کار گرفته شوند (Neinavaz *et al*., 2012; Rahman *et al*., 2004). به منظور آنالیز ترکیبی مانند نفت خام، آنالیز مادون قرمز در منطقه‌ی طیفی ۴۰۰۰-۵۰۰ cm^{-1} در رزولوشن ۵۰ cm^{-1} و از سل‌های NaCl و یاKBr استفاده شد. همچنین شرایط دمایی ۲۵ ºC بود (Ramadha *et al*., 2013; Hasanshahian *et al*., 2008).

شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی اولیه سویه های جداسازی شده از تست های بیوشیمیایی از قبیل رنگ آمیزی گرم، احیای نیترات، SIM، سیمون سیترات، کاتالاز، اکسیداز و TSI استفاده شد (Holt *et al*., 1998).

شناسایی مولکولی

شناسایی ملکولی باکتری های برتر تجزیه کننده با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rDNA انجام شد. پرایمرها

Bac27_F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) و Uni_1492R (5´-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3´)

روش PCR به منظور تکثیر ناحیه‌ی ژنی مذکور استفاده شد. واکنش تکثیر با حجم نهایی۲۵ میکرولیتر شامل، ۱ میکرولیتر $mgcl_2$ (غلظت۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Bac27_F، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNApolymerase 5U، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (غلظت۱۰ میکرو مولار)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Uni 1492R، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۹/۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی انجام گردید (Sambrook and Russell, 2001).
سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمای دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند bp ۱۴۰۰ از ژل آگارز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و جهت تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شده و همولوژی آنها بررسی گردید (Hassanshahian *et al*., 2010).

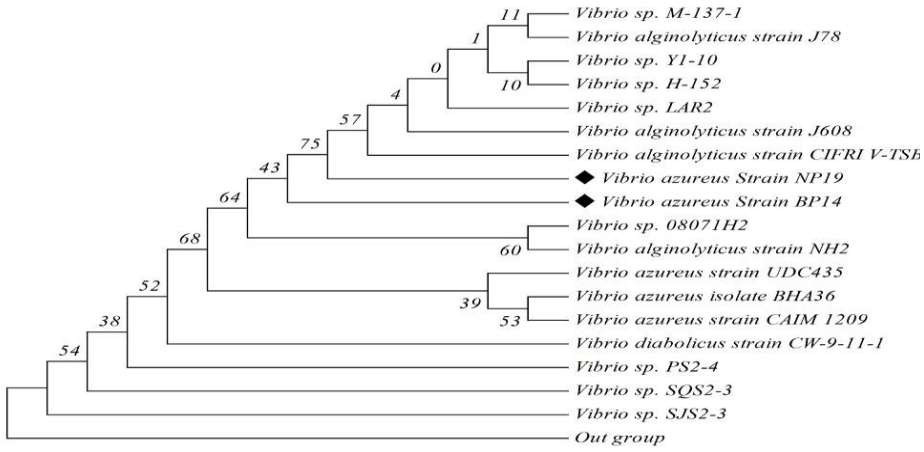
نتایــج

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

در این تحقیق ۹ جدایه باکتریایی تجزیه کننده جداسازی شد. از این ۹ جدایه تعداد ۵ جدایه از بندر خمیر و ۴ جدایه از بندر میناب جداسازی گردید. برخی از مشخصات این باکتری ها در جدول (۱) آمده است. پس از کشت جدایه ها درون محیط ONR7a حاوی۱٪ نفت خام ۳ جدایه BP14، NP16 و NP19 که بیشترین رشد را در نفت خام داشتند از بین ۹ جدایه جداسازی شده انتخاب گردیدند. برای شناسایی این جدایه ها ابتدا از تست های بیوشیمیایی استفاده شد. که نتایج به دست آمده در جدول (۱) آمده است. توالی‌های حاصله در بانک های ژنی بلاست شدند و مشخص شد که دو جدایه BP14 و NP19 متعلق به گونه‌ی *Vibrio azureus* می باشند و جدایه NP16 متعلق به گونه‌ی *Pseudomonas salomonii* بودکه درخت فیلوژنی این جدایه ها در شکل‌های (۲) و (۳) آمده است. شماره های دستیابی این جدایه ها در بانک ژنی NCBI به صورت، جدایه BP14 با شماره:LN866607، جدایه NP16 با شماره LN866608 و جدایه NP19 با شماره: LN866609 می باشند.

جدول ۱. خصوصیات بیوشیمیایی جدایه های برتر و سایر جدایه های تجزیه کننده نفت خام

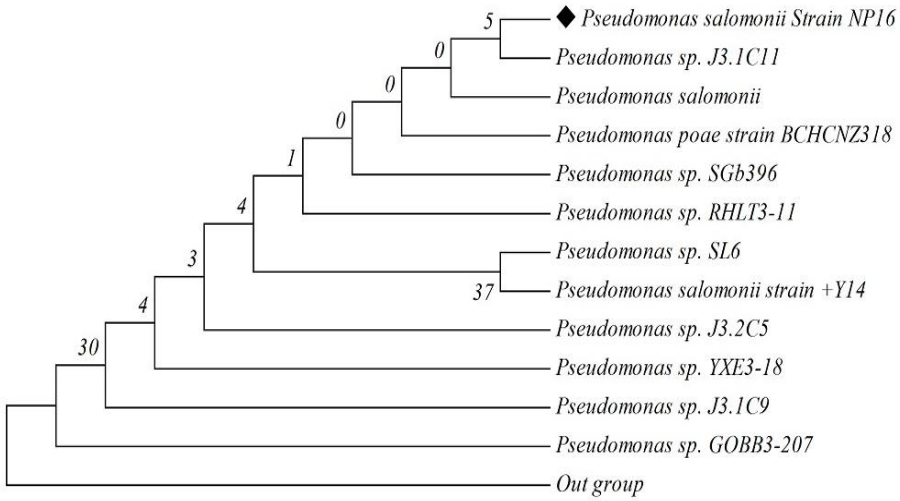
نام تست / نام جدایه	O/F	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	تولید H_2S	اندول	احیا نیترات	سیترات	TSI	رنگ آمیزی گرم
BP14	+/+	+	+	+	+	_	_	+	قلیا/اسید	ویبریو، گرم منفی
NP16	+/–	+	+	_	_	_	+	_	قلیا/قلیا	میله ای کوتاه، گرمنفی
NP19	–/+	+	+	+	+	_	+	+	قلیا/اسید	ویبریو، گرم منفی
NP66	–/+	_	+	_	_	_	+	+	قلیا/قلیا	کوکو باسیل، گرم منفی
NP67	+/–	_	+	_	_	_	_	_	قلیا/قلیا	کوکو باسیل، گرم منفی
NP69	–/–	+	+	_	_	_	_	+	قلیا/قلیا	باسیل کوتاه،گرم منفی
BP9	+/+	_	_	_	_	_	+	_	قلیا/قلیا	کوکوباسیل، گرم منفی
BP21	–/–	+	+	_	+	_	_	+	قلیا/قلیا	باسیل بلند، گرم منفی
BP64	+/–	+	+	_	_	_	+	+	قلیا/اسید	کوکوباسیل، گرم منفی



شکل ۲. درخت فیلوژنی جدایه های NP14 و NP19

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳. درخت فیلوژنی جدایه‌ی NP16

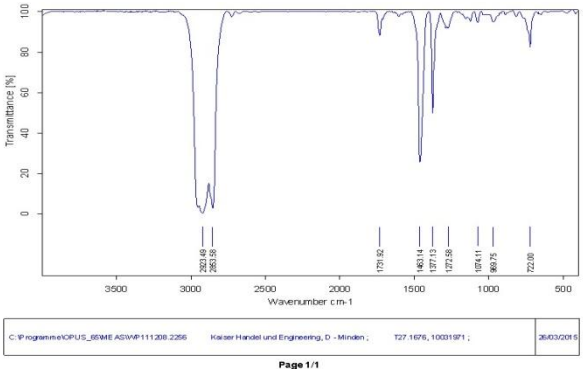
میزان رشد و حذف نفت خام جدایه ها

با کشت ۳ جدایه برتر درون محیط ONR7a براث حاوی ۱٪ نفت خام به مدت دو هفته، میزان رشد و حذف نفت خام با روش اسپکتوفتومتری بررسی شد. نتایج به دست آمده در جدول (۲) ارایه شده است. همانطور که در این جدول دیده می شود جدایه NP16 بالاترین میزان حذف را در بین جدایه های مورد بررسی دارا می باشد.

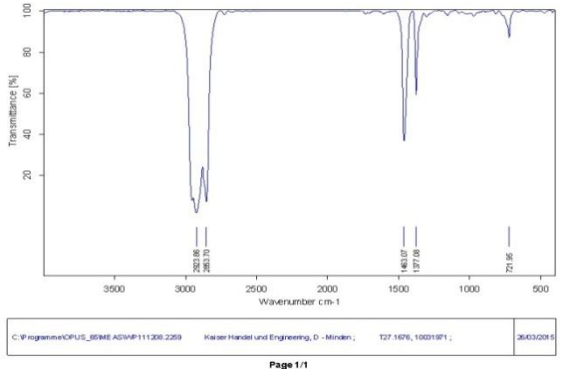
جدول ۲. درصد حذف و رشد جدایه های برتر جداسازی شده

نام جدایه	درصد حذف نفت خام	میزان رشد (OD_{600})
BP14	۶۰/۲۰	۱/۱۵۰
NP16	۶۶/۳۲	۰/۹۷۹
NP19	۶۵/۹۱	۱/۳٤

روش دیگری که در این تحقیق استفاده شد، روش FTIR بود که این روش براساس طیف سنجی مادون قرمز صورت می گیرد. آنالیز نفت خام حاصل از این روش این ترکیب پیچیده آلی را به دلیل وجود ترکیبات فراوان در آن به صورت پیک های ماکسیمم و مینیمم زیادی نشان داد (شکل ۴). با توجه به اندازه پیک های نفت خام و اندازه پیک های حاصل از تجزیه نفت خام توسط جدایه های برتر (شکل های ۵، ۶ و۷)، مشخص می شود که جدایه های مذکور، بسیاری از ترکیبات موجود در نفت خام را تجزیه کرده اند.



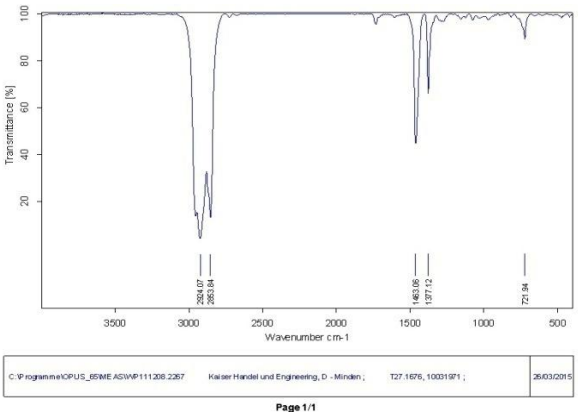
شکل ۴ . طیف FTIR نفت خام بدون باکتری (شاهد)



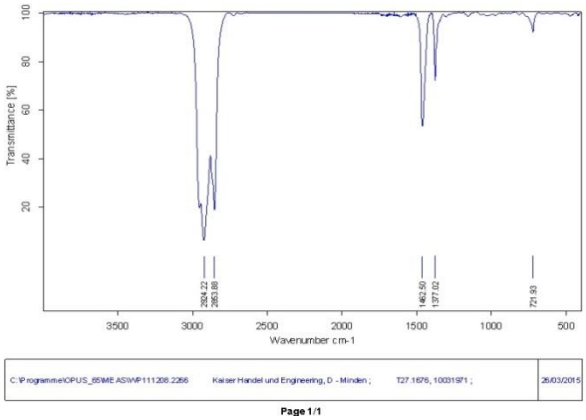
شکل ۵. طیف FTIR جدایه BP14

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶. طیف FTIR جدایه NP19



شکل ۷. طیف FTIR جدایه NP16

تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی

براساس نتایج به دست آمده (جدول ۳) مشخص شد که، جدایه‌ی NP16 دارای بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی و همچنین جدایه‌ی BP14 دارای بیشترین هیدروفوبیسیته سطح سلولی بود. براساس نتایج به دست آمده جدایه‌های BP14، NP16 و NP19 از بین جدایه‌های دیگر دارای بیشترین میزان حذف نفت خام بودند که این موضوع ارتباط مستقیمی با تولید بیوسورفاکتانت، فعالیت امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی این جدایه ها دارد. این موضوع در پژوهش های قبلی نیز اثبات شده است.

جدول ۳. میزان امولسیون کنندگی و هیدروفوبیسیته سطح سلولی جدایه ها

نام جدایه	درصد امولسیون (E_{24})	درصد هیدروفوبیسیته سطح سلولی (Bath)
NP66	۰	۰
NP67	۷	۰
NP16	۳۱	۰
NP69	۰	۰
NP19	۷	۲۰
BP9	۰	۰
BP21	۰	۰
BP64	۷	۳۳
BP14	۲٤	٤٥

بحث

بسیاری از محققان بر این موضوع تأکید دارند که جنگل های حرا حساس ترین اکوسیستم ساحلی در برابر آلودگی نفتی به حساب می آیند. تاکنون پژوهش های زیادی در مورد تجزیه زیستی نفت خام صورت گرفته است، به طوری که مشخص شده است ۷۹ جنس باکتریایی، توانایی استفاده از هیدروکربن های نفتی را به عنوان منبع کربن دارند. همچنین ۱۰۳ جنس قارچ، ۹ جنس سیانوباکتری و ۱۴ جنس جلبک از خود توانایی تجزیه و تبدیل هیدروکربن ها را نشان داده اند. اما در مورد تجزیه زیستی نفت خام در جنگل‌های حرا مطالعات نسبتاً کمی انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

(Head *et al*., 2006; Hassanshahian *et al*., 2012a; Hassanshahian *et al*., 2012b). این اکوسیستم از نظر تنوع و فراوانی باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی دارای تنوع بسیار بالایی است. در سالهای اخیر چندین گروه از محققین بر روی تنوع میکروارگانیسم های موجود در این اکوسیستم به منظور کاربرد سیستم‌های تصفیه زیستی به ویژه در شرایط آزمایشگاهی مطالعاتی را انجام داده اند. Brito و همکاران (۲۰۰۶)، گروهی از باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام به نام هیدروکربنوکلاسیک شامل جنس‌های، *Pseudomonas, Marinobacter, Alcanivorax, Microbulbifer, Sphingomonas, Micrococcus, Cellulomonas, Dietzia, Gordonia* را از جنگل های حرا کشور برزیل جداسازی نمودند. Ramsay و همکاران (۲۰۰۰)، تعداد زیاد و متنوعی از باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی را در رسوبات حرا کشور استرالیا گزارش کردند. Kafilzadeh و همکاران (2013b)، باکتری های برتر تجزیه کننده برخی از ترکیبات آروماتیک را از جنگل های حرا منطقه نایبند واقع در خلیج فارس جداسازی نمودند. در این تحقیق نیز با توجه به تعداد نمونه ها تنوع خوبی از باکتری های تجزیه کننده نفت خام مشاهده شد. به طوری که ۹ جدایه باکتریایی از جنگل های حرا میناب و بندر خمیر جداسازی شد. سه جدایه توانایی رشد و تجزیه بیشتری از خود نشان دادند و برای مراحل بعد انتخاب شدند که پس از شناسایی مولکولی این ۳ جدایه مشخص شدکه، ۲ جدایه متعلق به گونه *Vibrio azureus* و یک جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas salomonii* بودند.

به منظور بررسی میزان حذف نفت خام توسط باکتری ها از روش های گوناگونی استفاده می شود. Rahman و همکاران (۲۰۰۴) از روش جذب اسپکتروفتومتری در۴۲۰ نانومتر برای تخمین میزان تجزیه استفاده کردند. این محققین تعداد ۱۳۰ جدایه باکتریایی را از خاک های آلوده کشور انگلستان جداسازی کردند سپس میزان حذف نفت خام توسط سویه های برتر را مورد آنالیز قرار دادند.در این پژوهش نیز به منظور بررسی میزان حذف نفت خام از این روش استفاده شد و مشخص شد که ۲ جدایه متعلق به گونه *Vibrio azureus* و جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas salomonii* پس از گذشت ۱۰ روز بیش از نیمی از نفت خام را حذف کردند.

روش دیگر استفاده شده به منظور بررسی میزان حذف نفت خام روش FTIR بود. Ramadha و همکاران (۲۰۱۳)، از این روش به منظور بررسی میزان حذف نفت خام و سوخت دیزل استفاده نمودند. براساس نتایج این روش در تحقیق فعلی مشخص شد که ۳ جدایه برتر بسیاری از طیف ها (ترکیبات) موجود در نفت خام را در مقایسه با شاهد حذف نمودند.

بیوسورفاکتانت ها، یکسری ترکیبات هستندکه توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند و می توانند تنش موجود در سطح خارجی و داخلی سلول باکتریایی را کاهش دهند و باعث می شوند که باکتری بتواند هیدروکربن های نفتی را راحت تر در محیط آبی تجزیه کند Batista و همکاران (۲۰۰۶)، ۱۷ جدایه باکتریایی تولیده کننده بیوسورفاکتانت و تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی را از سواحل آلوده کشور برزیل جداسازی کردند. Bayoumi و El-Nagar (۲۰۰۹)، ۲۹ جدایه باکتریایی را از مانگروهای دریای سرخ جداسازی کردند که از میان آنها ۴ جدایه متعلق به گونه‌های *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Pseudomonas pseudomallei , Bacillus polymyxa* توانایی تولید بیوسورفاکتانت بالا و در نتیجه تجزیه بالای نفت خام را داشتند و برای تصفیه زیستی مکان های آلوده پیشنهاد شدند. در این تحقیق نیز باکتری های جداسازی شده از نظر تولید بیوسورفاکتانت دارای فراوانی بالایی بودند، که از میان آنها ۳ جدایه که توان تولید بیوسورفاکتانت بیشتری داشتند توانایی بالاتری در تجزیه نفت خام نسبت به سایر جدایه ها نشان دادند .

با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که، ۳ جدایه برتر جداسازی شده شامل ۲ جدایه *Vibrio azureus* و یک جدایه *Pseudomonas salomonii* توان تولید بیوسورفاکتانت را دارند و در نتیجه کارآیی بالایی در تجزیه بیش از نیمی از نفت خام در مدت زمان نسبتاً کوتاه دارند. پیشنهاد می شود که با تکثیر این باکتری ها و بهینه سازی شرایط، از آنها در مقیاس میدانی جهت پاکسازی آلودگی های نفتی جنگل های حرا استفاده شود.

منابـع

نوری، غ.، عرفانی، مو احسان زاده، ن.۱۳۹۰. کارکردهای اکولوژیکی و اقتصادی جنگل‌های مانگرو (مطالعه موردی: خلیج گواتر استان سیستان و بلوچستان). همایش منطقه ای جهاد اقتصادی رهیافت ها و راهبردها. چابهار.

www.SID.ir

Archive of SID

Alongi, D.M. 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. Environmental Conservation. 29 (3): 331-349.

Batista, S.B., Mounteer, A., Amorim, F.R., Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource Technology. 97: 868-875.

Bayat, Z., Hassanshahian, M., Askeri Hesni, M. 2015. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin. 101 (1): 85-91.

Bayoumi, R.A., El-Nagar, A.Y. 2009. Safe control methods of petroleum crude oil pollution in the mangrove forests of the Egyptian Red Sea coast. Journal of Applied Sciences Research. 5(12): 2435-2447.

Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., Duran, R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in guanabara bay, brazil. Research in Microbiology. 157(8): 752-762.

Eglinnton, G. 1975. Environmental chemistry. Vol.1. Specialist periodical reports. The Chemical Society, Burlington House, ISBN 0851867553, London.

Hasanshahian, M., 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 Biodegradation. 62: 170-178.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Kermanshahi, R., Cappello, S. 2010. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. Soil and Sediment Contamination. 19 (3): 277-291.

Hassanshahian, M., Tebyanian, H., Cappello, S. 2012a. Isolation and characterizationof two crude-oil degrading yeast strains, Yarrowia lipolytica PG-20 and PG-32from Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin. 64: 1386-1391.

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

Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., Kariminik, A. 2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). Marine Pollution Bulletin. 73: 300-305.

Hassanshahian, M., Zeynalipour, M.S., Hosseinzadeh, Musa, F. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Marine Pollution Bulletin. 82(1-2): 39-44.

Hayes, M.O., Gundlach, E.R. 1979. Coastal processes field manual for oil spill assessment. Prepared for NOAA, Office of Marine Pollution Assessment, Boulder, Colorado. Research Planning Institute, Inc., South Carolina.

Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. Nature Reviews Microbiology. 4: 173-182.

Holt, S.G., Kriey, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1998. Bergy's manual of determinative for Bacteriology. Williams and Wilkins, New York.

Kafilzadeh, F., Amiri, P., Rezaeian Jahromi, A., Mojoodi, N. 2013a. .Isolation and molecular identification of fluoranthene degrading bacteria from the mangrove sediments in South of Iran. International Journal of Biosciences. 3(5): 60-67.

Kafilzadeh, F., Rezaei, A., Nowrooz Nejad, M.J. 2013b. Evaluation of phenanthrene biodegradation by indigenous bacteria isolated from mangrove sediments in the Persian Gulf. Advances in Environmental Biology. 7(9): 2218-2224.

Kathiresan, K., Bingham, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. Advances in Marine Biology. 40: 81-251.

Maneerat, S., Kulnaree, P. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Applied Microbiology. 29: 783-791.

Neinavaz, E., Khalilzadeh Shirazi, E., Emami, B., Dilmaghani, Y. 2012. Investigation of reproductive birds in Hara Biosphere Reserve, threats and management strategies. In: The biosphere. Natarajan, I. (ed.). In Tech Publishing Group. 542 p.

www.SID.ir

Archive of SID

Proffitt, C.E. 1997. Managing oil spills in mangrove ecosystems: effects, remediation, restoration, and modeling. OCS Study MMS 97-0003. New Orleans: U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region. 76 p.

Pruthi, V., Cameotra, S.S. 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnology Technique. 11: 671-674.

Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., Hill, R.T. 2000. Effect of bioremediation communityin oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin. 41: 413-419.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2004.Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology. 85: 257-261.

Ramadha, B., Rehab, S., Jabbar, D., Rebah, N., NourAbdulatif, S. 2013. Isolation, identification, and assessment the ability of local *Streptomyces* isolate from Iraq to utilize crude oil and diesel fuel. Scientific Research and Impact. 2(1): 9-28.

Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 652 p.

Schaeffer-Novelli, Y., Cintrón-Molero, G., Soares, M.L.G., De-Rosa, T. 2000. Brazilian Mangroves. Aquatic Ecosystem Health and Management. 3: 561-570.

Vanmathy, K., Nithya, N. 2014. Production and biodegradation potentials of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa isolated from oil polluted water samples. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. 1(1):149-161.

www.SID.ir