نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۲ شماره ۴ صفحه‌های ۹۳ تا ۱۰۶/ سال ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

جداسازی باکتریهای تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های آلوده نفتی پالایشگاه و پتروشیمی تبریز و شناسایی باکتریهای کارآمد

مهناز افشارنیا[1]، محمدرضا ساریخانی*[2]، محمود زارعی[3]

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۲/۲٦ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰٤/۱۹

۱- دانش آموخته دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- استادیار شیمی کاربردی، دانشکده شیمی دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی از عمده‌ترین آلاینده‌های آلی در اکوسیستم‌های خاکی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. استفاده از ریزجانداران برای حذف یا کاهش آلودگی نفتی، یکی از راه‌های ارزان و دوستدار محیط زیست است، که جداسازی و ارزیابی کارایی باکتریها تجزیه‌کننده نفت، نخستین گام در استفاده از این روش می‌باشد. بر این اساس در این مقاله به نحوه جداسازی و ارزیابی کارایی باکتریهای نفت‌خوار پرداخته شده است. با بهره‌گیری از محیط‌های حداقل عاری از کربن (MSM) و غنی شده با نفت خام، ٦۰ جدایه باکتری از مکان‌های آلوده پالایشگاه و پتروشیمی تبریز جداسازی شد. از این میان، کارایی ۲۰ جدایه با استفاده از روش‌های مختلف کمی و کیفی (همانند OD و تولید بیوماس میکروبی، درصد تجزیه نفتی و تولید بیوسورفکتانت) بررسی شد. کاراترین جدایه‌ها که هم دارای OD، بیومس و درصد تجزیه نفتی بالایی بودند و هم به تست‌های تولید بیوسورفکتانت پاسخ مثبت دادند شامل ۱۰ جدایه COD2-1، COD1-5، COD4-3، COD4-2، COD9-3، COD6-3، COD7-1، COD3-1، COD1-1 و COD8-1 بودند. ۱۰ جدایه دیگر شامل COD1-4، COD5-6، COD4-5، COD7-3، COD4-6، COD6-1، COD6-4، COD2-3، COD8-2 و COD3-3 علی‌رغم داشتن OD، بیومس و درصد تجزیه نفتی بالا توانایی تولید بیوسورفکتانت نداشتند. نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌ها کارآمد نشان داد که این جدایه‌ها متعلق به جنس‌ها و گونه‌های *Stenotrophomonas* sp.، *Achromobacter* sp.، *Psedochrobactrum* sp.، *Arthrobacter* sp.، *Shewanella* sp.، *Alcaligenes* sp.، *Pseudomonas* sp. و *Acinetobacter baumannii* هستند و از بین این جدایه‌ها جنس‌های *Stenotrophomonas* sp.، *Psedochrobactrum* sp.، *Arthrobacter* sp. و *Shewanella* sp. با در نظر گرفتن شاخص‌های کیفی و کمی مورد مطالعه، برای آزمایشات زیست پالایی در خاکهای آلوده به نفت معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، بیوسورفکتانت، زیست پالایی ترکیبات نفتی، نفت خام

Isolation of Oil Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soil Around the Oil Refinery and Petrochemical Plants of Tabriz and Identification of the Efficient Bacteria

M. Afsharnia[1], M.R. Sarikhani[*2], M. Zareii[3]

Received: May 16, 2021 Accepted: July 10, 2021

1- Graduated PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

2- Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3- Assist. Prof. of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives

Petroleum hydrocarbons are the most common organic contaminants in water and soil ecosystems around the world. Application of soil microorganisms is one of the cost-effective and environmentally friendly approaches to remove or reduce the oil pollution. Isolation and assessment of oil-degrading bacteria is the first step in bioremediation. Accordingly, the aim of this study was isolation of crude oil degrading (COD) bacteria from contaminated soil samples around the refinery and petrochemical plants of Tabriz and assessment of their ability in oil degradation.

Methodology

In order to isolate the oil degrading bacteria from oil contaminated sludge collected from evaporation ponds of Tabriz Refinery, the carbon free minimal medium (CFMM) by enrichment methods were used. Based on bacterial growth indicators (e.g. optical density (OD) and microbial biomass, percent of crude oil degradation and production of biosurfactant), 20 efficient isolates were selected among the 60 isolates using CFMM supplemented with crude oil. All of these 20 isolates were evaluated by biosurfactant production tests. Then, 20 isolates were selected based on their growth rate, crude oil degradation potential, and their ability to degrade recalcitrant compounds (light naphta, heavy naphta, styrene and anthracene).

Findings

The most efficient strains that had the highest OD, microbial biomass and percentage of oil biodegradation with biosurfactant production ability were the isolates COD2-1, COD1-5, COD4-3, COD4-2, COD9-3, COD6-3, COD7-1, COD3-1, COD1-1 and COD8-1. While other efficient isolates (COD1-4, COD5-6, COD4-5, COD7-3, COD4-6, COD6-1, COD6-4, COD2-3, COD8-2 and COD3-3) did not produced biosurfactant. Among these bacteria, 11 efficient isolates were identified by molecular techniques. The results of molecular identification of bacteria showed that these isolates belong to the genus and species *Stenotrophomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Psedochrobactrum* sp., *Arthrobacter* sp., *Shewanella* sp., *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter baumannii*.

Conclusion

Among the isolates, the genus *Stenotrophomonas* sp., *Psedochrobactrum* sp., *Arthrobacter* sp. and *Shewanella* sp. with high quantitative and qualitative indices in terms of bacterial growth, microbial biomass, crude oil degradation and production of biosurfactant were the best candidates for bioremediation experiments in contaminated soil.

Keywords: Biosurfactant, Oil bioremediation, Oil contaminated soil, Oil degrading bacteria.

مقدمه

آلودگی خاک با نفت خام و مشتقات آن از جمله خطرناک‌ترین انواع آلودگی‌های زیست محیطی محسوب می‌گردد. رشد روزافزون صنعت نفت و صنایع جانبی در ایران، هیدروکربن‌های نفتی را جزء اولین آلاینده‌های محیطی به خصوص در مناطق جنوبی کشور و اطراف پالایشگاه‌ها، صنایع پتروشیمی و نیروگاه‌های کلان‌شهرهای ایران قرار داده است (صدیق بیان و همکاران ۲۰۱۷). طبق گزارشات بدست آمده از شرکت‌های پالایشگاهی و پتروشیمی کشور، از آلاینده‌های مهم نفتی خاک که بیشتر در اثر واژگونی تانکرهای انتقال‌دهنده ترکیبات نفتی حادث می‌شود می‌توان به نفت خام، نفتای سبک، نفتای سنگین و استایرن اشاره نمود. آبگریزی نسبتاً بالای هیدروکربن‌های نفتی موجب افزایش چشم‌گیر قابلیت تجمع آنها در خاک شده و منجر به کاهش دسترسی زیستی این آلاینده‌ها جهت حذف زیستی می‌گردد؛ لذا می‌بایست راهکارهای مناسبی جهت حذف یا کنترل آلاینده‌های نفتی در خاک اتخاذ شود (تندی و همکاران ۲۰۰۹). در سه دهۀ اخیر روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی نظیر تصفیه حرارتی، تثبیت و جامدسازی و زیست‌پالایی یا زیست‌سالم‌سازی[1]، جهت رفع آلودگی از خاک معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (دلافونته و همکاران ۲۰۱۱).

با بیان مشکلات ذکر شده و توجه به اصل حفظ بهداشت و سلامت جامعه و نیز اصل توجه به سلامت خاک‌ها در تولید بهینه محصولات کشاورزی، لزوم پاک‌سازی محیط زیست از آلاینده‌هایی مثل هیدروکربن‌های نفتی به وضوح قابل درک است و با توجه به اینکه یکی از مهمترین چالش‌هایی که در برابر سازمان‌های محیط زیست در اقصی نقاط دنیا قرار دارد مبارزه با آلودگی منابع خاک از یک طرف و احیا و پاکسازی مکان‌های آلوده شده از طرف دیگر است، از این رو بیشتر کشورهای پیشرفته به سمت تکنولوژی‌هایی چون گیاه‌پالایی و به طور کلی زیست‌پالایی روی آورده‌اند. همچنین زیست‌پالایی یکی از روش‌هایی است که می‌تواند در حذف یا کاهش آلودگی‌های نفتی بکار رود و برخلاف برخی از روش‌های گذرا و موقت، این روش در بعضی شرایط راه‌حل دائمی محسوب می‌گردد (آگوموتو و همکاران ۲۰۱۳). از آنجائی‌که خاک پالاینده طبیعی محسوب می‌شود و این ویژگی را مرهون خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خود است، بسیاری از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک قادرند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و آنها را به موادی از قبیل آب و دی‌اکسید کربن تبدیل نمایند (یو و همکاران ۲۰۱۱). جداسازی این میکروارگانیسم‌ها از محیط‌های آلوده نفتی و ارزیابی کارایی آنها در تجزیه نفت، تکثیر و بکارگیری آنها به‌صورت کنسرسیوم باکتریایی از مراحل ابتدایی زیست‌پالایی می‌باشد (مینوتیاقی ۲۰۱۱). تلقیح زیستی نوعی زیست پالایی است که با وارد کردن میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از محیط‌های غیربومی[2] صورت می‌گیرد، این روش برای مواد نفتی

[1] Bioremediation

[2] Exogenous

سرسخت که توسط میکروارگانیسم‌های بومی خاک قادر به تجزیه نیستند استفاده می‌شود؛ برای استفاده از این روش جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه بالای هیدروکربن‌های نفتی را دارند ضروری است. پس از جداسازی و شناسایی این باکتریها از آنها به‌صورت کنسرسیوم باکتریایی استفاده می‌شود که با افزودن مواد غذایی و ایجاد شرایط بهینه برای رشد آنها اقدام می‌شود تا بتوانند هیدروکربن‌های نفتی خاک را با سرعت بیشتری تجزیه نمایند (وو و همکاران ۲۰۱۳، گریر و همکاران ۲۰۱۰، ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۳).

در این پژوهش سعی بر آن شده است که از مکان‌های آلوده پالایشگاه و پتروشیمی تبریز، باکتریهای نفت‌خوار یا تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی جداسازی شده و با استفاده از انواع سنجش‌های کمی و کیفی و مقایسه آنها، بهترین و کاراترین باکتریها برای رفع آلودگی این خاک‌ها برای روش زیست پالایی شناسایی و معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتریهای تجزیه‌کننده نفت

نمونه‌برداری از ۹ مکان آلوده به نفت در پالایشگاه و پتروشیمی تبریز انجام شد. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی، ابتدا اقدام به غنی‌سازی میکروبی شد. برای غنی‌سازی، از محیط کشت حداقل MSM عاری از منابع کربن با کمی تغییرات استفاده شد. هر لیتر محیط کشت MSM شامل؛ 2 g NH_4Cl، 5 g KH_2PO_4، 4 g Na_2HPO_4، 0.2 g $MnSO_4$، 0.2 g $MgSO_4$، 0.05g $FeCl_3$، 0.001g $CaCl_2$، 0.001g $CoCl_2$، 0.0001g $(NH_4)_6Mo_7O_2$ بود که pH آن ۷/۲ تنظیم شد و پس از صاف کردن با کاغذ صافی واتمن شماره یک و اتوکلاو مورد استفاده قرار گرفت (مایتی و باتاچاریا ۲۰۱۲). بدین ترتیب ۱۰ گرم از نمونه خاک آلوده به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSM استریل حاوی ۳٪ نفت خام افزوده شد و به مدت ۱ هفته در دمای ۲۶ °C و شیک ۱۲۰ rpm قرار گرفت. همچنین ۱۰ گرم از نمونه خاک بدون افزودن نفت خام در محیط MSM نیز به عنوان شاهد لحاظ شد. بعد از گذشت یک هفته، یک زیرکشت تهیه شد؛ بدین صورت که ۲ میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSM استریل تازه حاوی ۳٪ نفت خام اضافه شد و مجدداً به مدت یک هفته دیگر در شرایط فوق قرار گرفت. پس از گذشت زمان و مشاهده رشد باکتری و OD کافی در ارلن‌ها در مقایسه با ارلن شاهد، اقدام به تهیه سری رقت شده و سپس از رقت‌های 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به محیط کشت MSM جامد حاوی ۲ درصد نفت خام اضافه و با کمک میله شیشه‌ای پخش شد. بعد از ظهور کلنی‌ها در سطح پلیت (شکل ۱)، کلنی‌های منتخب به محیط نوترینت آگار انتقال داده شدند و با انجام زیرکشت‌های متوالی و پس از اطمینان از خلوص کلنی‌ها اقدام به تهیه استوک جدایه‌ها در گلیسرول ۱۵٪ شد.

ارزیابی کارائی تجزیه نفت خام

برای بررسی کارائی تجزیه ترکیبات نفتی، ابتدا از جدایه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث کشت شبانه داده شد و پس از سانتریفیوژ نمودن، روشناور آنها دور ریخته شد و رسوب باکتری با سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ شستشو داده شد و سپس رسوب باکتری در ۳ میلی‌لیتر از سرم معلق شد و ۱ میلی‌لیتر از آن برای تلقیح در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM استریل دارای ۲٪ نفت خام افزوده شد. ارلن‌ها به مدت ۹ روز در دمای ۲۶ °C و ۱۲۰ rpm شیک شدند (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۲). این آزمایش برای هر جدایه در ۳ تکرار و با حضور ارلن شاهد بدون تلقیح باکتری انجام گرفت. بعد از گذشت ۹ روز آزمایشات زیر شامل (قرائت چگالی نوری، توزین بیوماس میکروبی، تعیین درصد تجزیه نفت خام و تست‌های تولید بیوسورفکتانت) انجام گرفت.

چگالی نوری[1] یا OD محیط کشت باکتریها

[1] OD: Optical Density

بعد از گذشت ۹ روز و کدر شدن محیط‌های کشت، ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت‌ها پس از هم زدن به داخل کوت اسپکتروفتومتر ریخته شد و چگالی نوری آنها در طول موج ٦٠٠ nm قرائت شد. لازم به ذکر است که بعد از قرائت اولیه OD و به دست آمدن اعداد بیش از یک، ابتدا نمونه‌ها رقیق شده تا اعداد قرائت شده در محدوده کمتر از ۱ قرار گیرند و نتایج پس از تصحیح اثر رقت گزارش شده است. مبنای این روش آن است که باکتریهایی که از ترکیبات نفتی بهتر استفاده می‌کنند قادر به تولید و تکثیر بیشتری بوده و ضمن افزایش بیوماس میکروبی باعث افزایش OD محیط خواهند شد (مایتی و باتاچاریا ۲۰۱۲، ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۳).

اندازه‌گیری بیومس میکروبی

حجم مناسبی از محیط کشت‌ها به درون ویال‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و روشناور آن دور ریخته شد و وزن پلت باکتری بعد از خشک شدن درون آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت یادداشت شد (چندانکری و همکاران ۲۰۱۳).

درصد تجزیه نفت خام

برای محاسبه میزان نفت تجزیه شده از رابطه ۱ استفاده شد. برای این کار ابتدا به باقیمانده محیط کشت، ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر اضافه شد، پس از همزدن محیط، به داخل قیف جداکننده استوانه‌ای ریخته شد و بدین ترتیب نفت خام حل شده در دی‌اتیل‌اتر از محیط کشت باکتری جدا شد؛ سپس نفت خام و دی اتیل اتر جدا شده در لوله‌های آزمایش ریخته شد و در بن‌ماری در ٣٦ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از تبخیر کامل دی‌اتیل‌اتر پس از ۱۸ ساعت، مقادیر نفت خام باقیمانده که بصورت ته نشست با ویسکوزیته بالا در ته لوله جا مانده بود، برای نمونه شاهد و جدایه‌های باکتریایی توزین شد (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۳).

[۱]

$$\%B = 100\ (W_1 - W_C) / W_1$$

B درصد تجزیه زیستی، W_1 وزن نفت باقیمانده در نمونه شاهد و W_C وزن نفت باقیمانده در جدایه‌ها می‌باشد.

تست‌های تولید بیوسورفکتانت

فعالیت گستردگی روغن[1]

این تست با اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در داخل پتری دیش و اضافه کردن µL ۱۰۰ نفت خام به سطح آب انجام گرفت. سپس µL ۱۰ از روشناور حاصل از محیط‌های کشت بر روی لایه نفتی ایجاد شده، ریخته شد. قطر قطره عاری از نفت اندازه‌گیری شد (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۳). در این آزمایش دو تیمار SDS[2] به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تست همولیز خون بر روی بلاد آگار[3]

به میزان µL ۱۰ از محیط کشت جدایه‌های باکتری برداشته شد و بر روی بلاد آگار حاوی ۵٪ (v/v) خون گوسفندی در پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای در سه تکرار کشت داده شد و در ٢٦ °C داخل انکوباتور به مدت ۵ روز نگهداری شدند (ابراهیم و همکاران ۲۰۱۳). لازم به توضیح است که خون تازه گوسفندی برای این منظور استفاده شد و تا قبل از افزودن در ارلن حاوی محیط کشت بلاد آگار به منظور ممانعت از انعقاد خون در سیترات سدیم ٤٪ در فالکون استریل نگهداری شد. فعالیت همولیزی بلاد آگار با ایجاد یک هاله شفاف به دور کلنی‌ها ظاهر می‌شود که نشاندهنده تولید بیوسورفکتانت توسط جدایه‌ها می‌باشد. باکتری‌هایی که در اطرافشان پس از گذشت پنج روز هاله شفاف تشکیل نشده بود با علامت (−) و هاله کوچک و نازک با علامت (+)، هاله متوسط (++) و هاله بزرگ (+++) و هاله خیلی بزرگ (++++) ثبت شدند که این هاله‌ها بصورت مقایسه‌ای نشان داده شدند (شکل ۱).

[1] Oil displacement activity
[2] Sodium dodecyl sulfate
[3] Hemolysis test on blood agar

تست CTAB[1] متیلن بلو آگار

برای انجام این تست ۱۰ µL از کشت هر جدایه باکتری برداشته شد و بر روی CTAB متیلن بلو آگار (حاوی ۰/۲ mg mL^{-1} CTAB و ۰/۰۰۵ µg mL^{-1} متیلن بلو در نوترینت آگار) در پلیت‌ها به صورت نقطه‌ای در سه تکرار کشت داده شد و در ۲۶ °C داخل انکوباتور به مدت ۵ روز نگهداری شدند (چندانکری و همکاران ۲۰۱۳). ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم برومایـد (CTAB) یک دترجنت کاتیونی می‌باشد، بنابراین ایجاد یک هاله آبی پررنگ به دور کلنی‌ها در این محیط که رنگ پایه آن آبی روشن می‌باشد، نشان‌دهنده تولید بیوسورفکتانت آنیونی از طرف جدایه‌ها می‌باشد. باکتری‌هایی که در اطرافشان پس از گذشت پنج روز هاله آبی تشکیل نشده بود با علامت (−) و هاله کوچک و نازک آبی با علامت (+)، هاله متوسط (++) و هاله بزرگ (+++) و هاله خیلی بزرگ (++++) ثبت شدند که این هاله‌ها بصورت مقایسه‌ای نشان داده شدند (شکل ۱).

برای بررسی کارائی تجزیه سایر ترکیبات نفتی مهم (از جمله نفتای سبک و سنگین، استایرن و آنتراسن) توسط جدایه‌ها، این مواد نیز با غلظت‌های مناسب و در محیط کشت پایه در شرایط درون‌شیشه‌ای[2] ارزیابی شدند. ابتدا از ۱۳ جدایه برتر حاصل از ارزیابی در محیط کشت نفت خام که دارای OD، بیومس میکروبی و درصد تجزیه نفت خام بالا بوده و تند رشد بودند در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث کشت شبانه داده شد و پس از سانتریفیوژ، روشناور آنها دور ریخته شد و رسوب باکتری با سرم فیزیولوزیک ۰/۹٪ شستشو شد و سپس رسوب باکتری در ۳ میلی‌لیتر از سرم معلق شد و ۱ میلی‌لیتر از آن برای تلقیح در ٤ سری آزمایش شامل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM استریل الف) با ۲۰۰۰۰mg L^{-1} نفتای سنگین ب) با ۲۵۰۰ mg L^{-1} نفتای سبک ج) با mg L^{-1} ۱۰۰۰ استایرن (عرب جعفری و همکاران ۲۰۱۷) د) با ۱۰۰ mg L^{-1} آنتراسن (مااوچنگ و همکاران ۲۰۱٤) افزوده شد. ارلن‌ها به مدت ۹ روز در دمای ۲٦ °C و ۱۲۰ rpm شیک شدند. این آزمایش برای هر جدایه در ۳ تکرار و با حضور ارلن شاهد بدون تلقیح باکتری انجام گرفت. بعد از گذشت ۹ روز آزمایشات قرائت OD و توزین بیوماس میکروبی به روش فوق‌الذکر انجام گرفت.

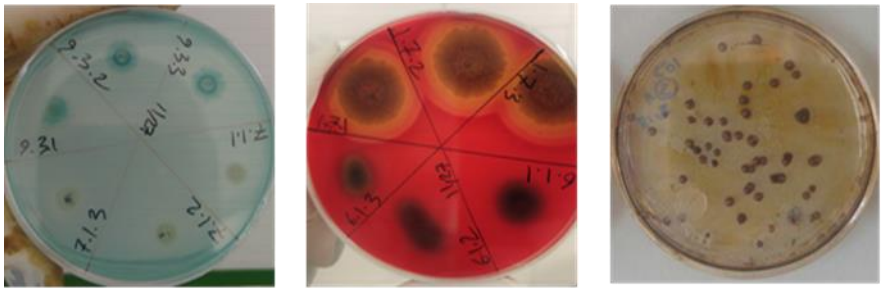
ارزیابی کارائی تجزیه ترکیبات نفتی (نفتا، استایرن و آنتراسن)

شناسایی مولکولی باکتریهای کارآمد

توالی‌یابی و آنالیز ژن رمزکننده 16S rRNA برای شناسایی جدایه های باکتریایی انجام شد. DNA جدایه‌ها به روش جوشاندن با KOH ۱۰٪ استخراج شد؛ بدین ترتیب که یک لوپ پر از باکتری‌های خالص کشت شده بعد از ۲٤ ساعت برداشته شد و داخل میکروتیوب‌های حاوی ۵۰۰ µL بافر TBE (0.5X) و µL ۲۰ KOH (۱۰٪) منتقل شد. بعد از ۱۰ دقیقه جوشاندن میکروتیوب‌ها با دور ۱۲۰۰۰ rpm برای ٤ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از روشناور ۱۰۰–۲۰۰ µL که حاوی DNAاستخراج شده بود برداشته شد و برای انجام واکنش PCR استفاده شد. برای توالی‌یابی ژن 16S rDNA باکتریها از دو پرایمر پیشرو 8F با توالی (´5 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ´3) با ۲۰ نوکلئوتید و پسرو 1490R با توالی (´5 GGTTACCTTGTTACGACTT ´3) با ۱۹ نوکلئوتید استفاده شد. برای واکنش PCR کل حجم هر ویال µL ۵۰ بود که هر نمونه شامل ۲۵ µL Taq 2x Mastermix و ۱۵ µL آب دیونیزه و ۲ µL از هر پرایمر F و R بعلاوه DNA استخراج شده از هر باکتری به مقدار ٦ µL بود. واکنش PCR در ۳٦ چرخه اجرا شد. چرخه اول با دمای

[1] Cetyl trimethylammonium bromide
[2] In vitro

°C ۹٤ به مدت ۳ دقیقه، در ادامه دمای °C ۹٤ به مدت ۲۰ ثانیه، دمای °C ۵۳ (دمای اتصال آغازگر) به مدت ۲۰ ثانیه، دمای فراوان شدن °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک چرخه اضافی با دمای °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بعد از اختلاط با DNA Safe Stain بر روی ژل آگارز (W/V) ٪۱ در بافر 1x TBX در داخل چاهک‌ها ریخته و الکتروفورز شدند (قالکیویزل و کلاگ ۲۰۰۸). پس از مشاهده موفقیت تکثیر باندها، نمونه توالی‌یابی شد و پس از انجام BLAST-N در سایت NCBI، و شناسایی باکتریها، درخت فیلوژنی آنها با نرم‌افزار MEGA6 ترسیم گردید.



شکل ۱- تصویر مراحل جداسازی اولیه (سمت راست)، تست همولیز خون (وسط)، تست CTAB (سمت چپ).

رسم درخت فیلوژنی

توالی ژن رمزکننده 16S rRNA توسط شرکت ژن‌فناوران توالی‌یابی شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها مجدداً به کمک نرم افزار Chromas (1.45) بررسی شد. میزان تشابه توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rRNA جدایه به کمک BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank مورد مقایسه قرار گرفت. تحلیل فیلوژنی جدایه‌ها و ترسیم درخت فیلوژنی توالی ژن 16S rRNA جدایه‌ها به کمک نرم افزار MEGA6 و با الگوریتم Maximum Liklihood، رسم گردید (شکل ٤).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال سه تکرار انجام شد و تجزیه آماری داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS صورت پذیرفت و نمودارهای آن به کمک نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

بعد از رشد کامل باکتری‌ها و کلنی‌ها در مرحله اول جداسازی، ٦۰ جدایه جداسازی شد که با توجه به واکنش گرم، شکل سلولی، رنگدانه و الگوی رشد، کلنی-های مشابه حذف شده و ٤٤ جدایه متفاوت از لحاظ مورفولوژی نگهداری و برای مراحل بعدی کار انتخاب شدند.

ارزیابی باکتریها در حضور نفت خام

الف) ارزیابی OD باکتریها در حضور نفت خام

از بین ٤٤ باکتری جدا شده از محیط کشت حاوی نفت خام ۸ جدایه دارای OD بالایی بودند، جدایه-های COD4-3[1] و COD4-2 (به ترتیب ۱۲/۱۸ و ۱۰/٤۵) بیشترین OD را داشته و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. جدایه‌های COD9-3، COD4-6 و COD1-4 هر سه به ترتیب ۷/۱، ٦/٦۵ و ٦/٦۳ اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشتند ولی اختلاف معنی‌داری بین آنها دیده نشد (جدول ۱). بین OD، بیومس و درصد تجزیه نفتی ضریب همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود داشت، این ضریب بین OD و بیومس میکروبی ۰/۷۱ و بین OD و درصد تجزیه نفتی ۰/۸۲ بود. جدایه‌هایی که در آنها میزان OD محیط کشت بیشتر بود؛ نفت خام باقیمانده در محیط نیز کمتر بود و بیشتر توانسته بودند نفت خام

[1] پیشوند COD مخفف Crude Oil Degrading بوده، و جدایه ۳-۴ COD معرف شماره خاک ۴ و شماره جدایه ۳ است.

را تجزیه کنند. جدایه‌های باکتریایی به دلیل اینکه از خاکها و محیطهای آلوده نفتی جداسازی شده‌اند با محیط کشت‌های آلوده به نفت و ترکیبات نفتی سازگار هستند و زنده ماندن و تکثیر آنها و افزایش جمعیت میکروبی در محیط کشت نشاندهنده افزایش میزان تخریب هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد بنابراین از این باکتریها می‌توان به عنوان تصفیه کنندگان طبیعی ترکیبات نفتی در خاک نام برد (سانینو و همکاران ۲۰۱٦).

ب) بیومس میکروبی در حضور نفت خام

بیومس میکروبی در حجم ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت اندازه‌گیری شد. باکتری COD3-3 با مقدار mg ۵ mL^{-1} دارای بالاترین بیومس میکروبی در میان همه جدایه‌ها بود ولی با توجه به نتایج OD، جدایه‌های مشترکی که هم دارای OD بالاتر و هم بیومس میکروبی بالایی بودند، در این مرحله انتخاب شدند. جدایه‌های COD4-5 و COD6-3 که علاوه بر OD بالا (به ترتیب ۲/۳۵ و ۲/٤۵) بیشترین بیومس میکروبی (به ترتیب mg ٤/۸۳ mL^{-1} و ٤/۳۳) را نیز داشته و اختلاف معنی‌داری بین آنها و سایر جدایه‌ها مشاهده شد. جدایه‌های COD1-5، COD7-3، COD3-1، COD5-6، COD6-1، COD6-4 و COD2-1 نیز دارای بیومس میکروبی بالا بودند. ضریب همبستگی بین بیومس میکروبی و درصد تجزیه نفتی ۰/۹۰ بود و نشاندهنده آن است که توان بالای تجزیه زیستی نفت را داشته‌اند و توانسته‌اند از نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند، درنتیجه بهتر رشد کرده و جمعیت و بیومس میکروبی آنها بیشتر شده است (جدول ۱). داس و موخرجی (۲۰۰٦) گزارش کردند که دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* جداسازی شده از خاکهای آلوده به نفت در محیط کشت MSM و دوره نگهداری ۵ روزه توانسته‌اند به ترتیب ۲٤٪ و ۲٦٪ از کل هیدروکربن‌های نفتی را در طول ۵ روز تجزیه کنند؛ آنها دریافتند که میزان بیومس سلولی با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد.

ج) درصد تجزیه نفت خام توسط جدایه‌ها

در بین جدایه‌ها، جدایه COD1-4 با بالاترین درصد تجزیه نفتی (۸۸/۲۵٪)، دارای اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها بود. باکتری‌های COD5-6 و COD1-5 به ترتیب با ۷۷/٤٦٪ و ۷٤/۹۵٪ از جدایه‌هایی بودند که دارای بالاترین درصد تجزیه نفتی و بیومس میکروبی (به ترتیب ۳/۱٦ و ۳/۵ mg mL^{-1}) بودند. جدایه‌های COD7-3، COD3-1، COD6-1 و COD2-1 نیز دارای توان بالای درصد تجزیه نفتی بوده و دارای بیومس میکروبی بالایی بودند. جدایه‌های COD1-4، COD9-3، COD6-3، COD4-3، COD4-2، COD4-5، COD4-6 و COD7-1 جدایه‌هایی مشترک در OD و درصد تجزیه نفتی بالا بودند. جدایه‌های COD9-4، COD1-1، COD1-2 و COD8-1 نیز از جدایه‌هایی بودند که فقط درصد تجزیه نفت بالایی داشتند (جدول ۱).

باکتری‌ها و قارچ‌ها تنها گونه‌های زیستی دارای توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود هستند. ۵۰-۱۳ درصد هیدروکربن‌های نفتی توسط باکتری‌ها و ۸۲- ۵۰ درصد توسط قارچ‌ها تجزیه می‌شوند؛ اما برای پاک‌سازی خاک‌ها از باکتری‌ها به دلیل فراوانی ، سرعت رشد زیاد تر و توان استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها، بیشتر استفاده می‌شود (ولیکا و همکاران ۲۰۰۹). زفرا و همکاران (۲۰۱٤) در تحقیق خود گزارش کردند که جدایه‌های حاصل از خاکهای آلوده به نفت که دارای آستانه تحمل بالایی در مقابل PAHها هستند شامل جنس‌های قارچی *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium*، *Trichoderma*، *Scedosporium* و *Acremonium* و باکتریایی *Pseudomonas*، *Klebsiella*، *Bacillus*، *Enterobacter*، *Streptomyces*، *Stenotrophomonas*، *Kocuria* و *Delftia* می‌باشند. آنها در آزمایش خود کنسرسیومی از ۱۲ جدایه قارچی و باکتریایی جداسازی شده جهت تجزیه ترکیبات PAH تا غلظت ٦۰۰۰ mg L^{-1} را بکار بردند که

در طول دوره ١٤ روزه ٨٧- ٥٦٪ تجزیه این مواد گزارش شده است. ابوشناب و همکاران (٢٠١٦) با افزودن ٤٪ نفت خام به محیط کشت عاری از کربن آلی موفق به جداسازی و شناسایی باکتریهای تجزیه کننده نفت شامل *Ochrobactrum cytisi*، *Ochrobactrum anthropi* و *Sinorhizobium meliloti* شدند که قادر به تجزیه ٩٣-٥٤٪ از کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) بودند.

ارزیابی OD باکتریها در حضور مواد نفتی

در آزمایش ارزیابی باکتریها در تجزیه نفتای سبک و سنگین، استایرن و آنتراسن نتایج حاکی از آن بود که در محیط کشت حاوی نفتای سنگین جدایه‌های COD1-4، COD1-1، COD2-1، COD2-3 وCOD5-6؛ در محیط کشت حاوی نفتای سبک جدایه‌های COD1-4، COD1-1، COD4-6، COD4-2 وCOD2-1؛ در محیط کشت حاوی استایرن جدایه‌های COD2-3، COD5-6، COD4-6، COD6-1 وCOD2-1؛ در محیط کشت حاوی آنتراسن جدایه‌های COD2-3، COD3-3، COD1-1، COD6-3، وCOD8-2؛ به ترتیب دارای بیشترین OD بودند (شکل ٢). عرب جعفری و همکاران (٢٠١٧) گزراش کردند که باکتری *Rhodococcus erythropolis* توانسته است در محیط کشت حاوی ٢٢٠ mg L^{-1} استایرن تکثیر یافته و OD آن افزایش یابد و بتواند از استایرن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آنرا تجزیه نماید.

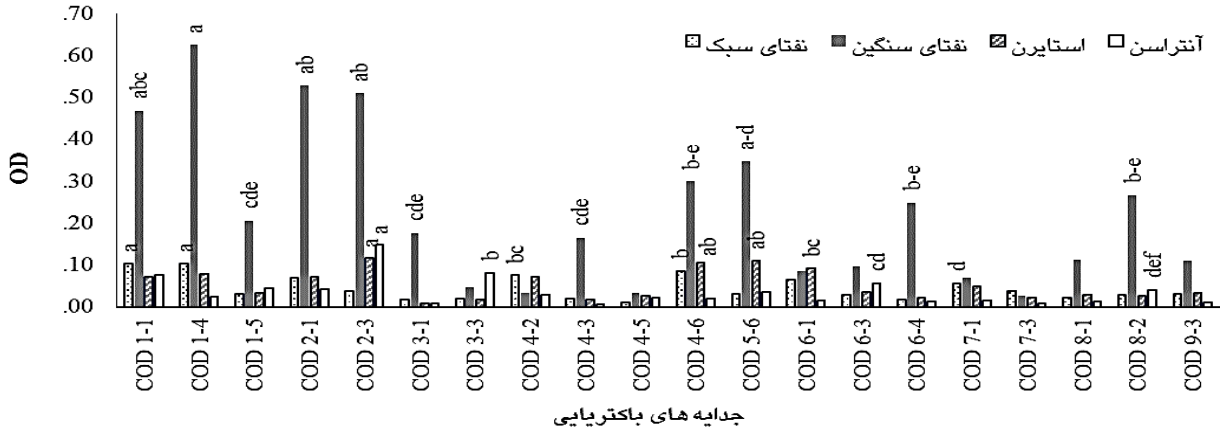
ارزیابی بیومس باکتریها در حضور نفتا، استایرن و آنتراسن

در آزمایش مقایسه بیوماس باکتریها در حضور نفتای سبک و سنگین، استایرن و آنتراسن نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی نفتای سنگین جدایه‌های COD1-1، COD2-1 و COD1-4؛ در محیط کشت حاوی نفتای سبک جدایه‌های COD2-3، COD1-1 وCOD2-1؛ در محیط کشت حاوی استایرن جدایه‌های COD1-1، COD2-3، COD5-6 و COD4-6 در محیط کشت حاوی آنتراسن جدایه‌های COD2-3، COD3-3 و COD1-1 به ترتیب دارای بیشترین بیومس بودند (شکل ٣). باکتری‌های جداسازی شده از محیط‌های آلوده نفتی در محیط کشت‌های حاوی هیدروکربن‌های نفتی پس از انکوباسیون و شیک کردن قادر به افزایش بیومس میکروبی خود هستند چرا که از این هیدروکربن‌ها بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. آرولاژاگان و همکاران (٢٠١٠) گزارش کردند که کنسرسیومی از باکتری‌های جداسازی شده از رسوبات نفتی توانسته است در محیط کشتهای حاوی PAH شامل آنتراسن، فلورن، نفتالین و فنانترن در محدوده غلظت‌های mg L^{-1} ١٠٠ -٣ در محیط کشت شور حاوی NaCl بیومس میکروبی را افزایش داده و موجب تجزیه ٤٥-٩٥٪ ترکیبات PAH شود. مااو و همکاران (٢٠١٥) گزارش کردند که *Pseudochrobactrum* sp. با تابش اشعه ماورا بنفش و جهشی که در این باکتری بوجود آمده است این باکتری را قادر ساخته است که ١٨٠٠ mg L^{-1} فنول فاضلاب را در عرض ٤٨ ساعت تجزیه نماید. نتایج آزمایش نشان داد که *Pseudochrobactrum* sp. XF1-UV می تواند یک کاندیدای امیدوار کننده برای بهبود زیست محیطی فاضلاب های حاوی فنل باشد.

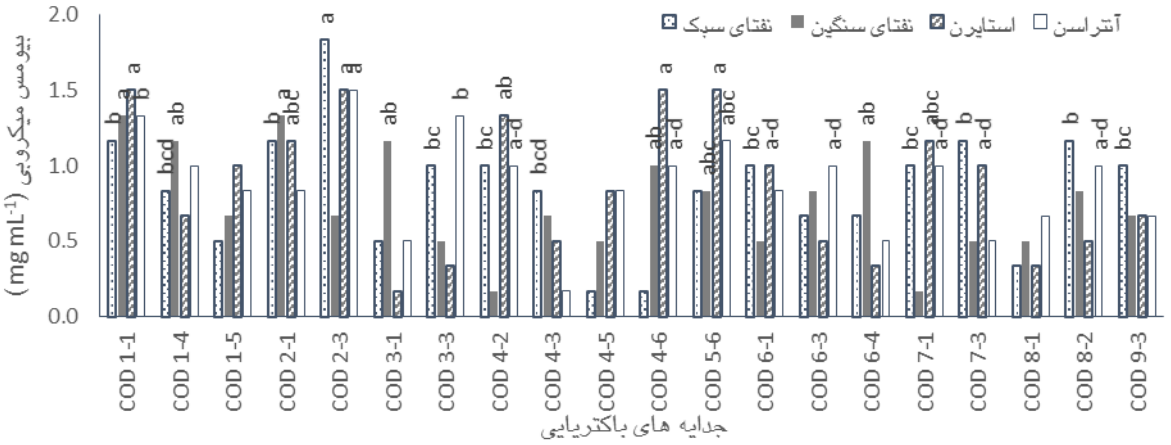
تولید بیوسورفکتانت

لازم به توضیح است که + بودن تست‌های بیوسورفاکتانت موجود در جدول ١ نشاندهنده پاسخ مثبت بودن آن جدایه به تولید بیوسورفاکتانت است تعداد + های جدول ١ نشان دهنده بیشتر بودن تولید سورفاکتانت و بزرگ‌تربودن قطر هاله همولیز شده خون و هاله آبی رنگ در تست CTAB نسبت به جدایه-های دیگر است و – بودن تست‌ها نشان دهنده عدم تولید سورفاکتانت توسط آن جدایه یا به عبارتی عدم تشکیل هاله می‌باشد. جدایه‌های COD9-3 و COD8-2 به هر سه تست گستردگی روغن و بلاد آگار و CTAB آگار پاسخ مثبت دادند. جدایه‌های COD2-1، COD1-7 و COD8-1 هر سه به گستردگی روغن و بلاد آگار پاسخ مثبت نشان دادند. جدایه COD3-4 به دو تست

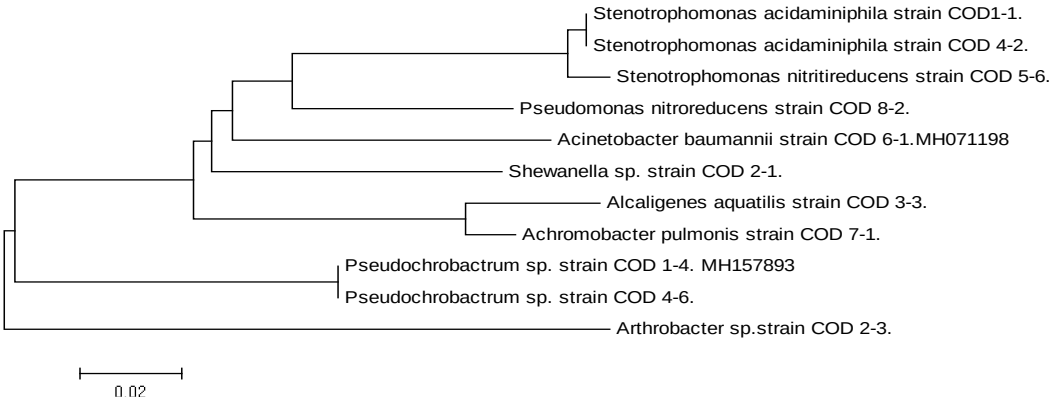
گستردگی روغن و CTAB آگار پاسخ مثبت نشان داد. جدایه COD4-3 به تست بلاد آگار پاسخ مثبت داده و دارایOD و درصد تجزیه نفتی بالایی بود. تستهای تولید بیوسورفاکتانت نشان دهنده تولید بیوسورفاکتانت دو قطبی توسط این باکتریها بوده که دارای هر دو سطح هیدروفیلی و هیدروفوبی هستند و باعث گیرافتادن ماده نفتی در بخش درونی غیر قطبی شده و افزایش حل پذیری آن در قسمت بیرونی یا قطبی بیوسورفاکتانت می شوند. درجدایه هایی که پاسخ مثبت به تولید بیوسورفاکتانت دادند نسبتا میزان تجزیه نفتی و OD محیط نیز بالا بود.(جدول ۱). تجزیه PAHها بدون اعمال تیمارهای زیست پالایی در خاک کمتر گزارش شده است و این می‌تواند



شکل ۲- مقایسه OD جدایه‌های باکتریایی در حضور نفتای سبک، نفتای سنگین، استایرن و آنتراسن.



شکل ۳- مقایسه بیومس میکروبی جدایه‌های باکتریایی در محیط کشتهای نفتای سبک، نفتای سنگین، استایرن و آنتراسن.



شکل ۴- درخت فیلوژنی ۱۱ جدایه باکتری شناسایی شده کارای تجزیه نفتی.

جدول ۱- مقادیر OD، بیومس میکروبی، درصد تجزیه نفت خام و نتایج تست تولید بیوسوفکتانت ۴۴ جدایه جداسازی شده.

جدایه های باکتری	OD 600nm	بیومس میکروبی (میلی گرم در میلی لیتر محیط کشت)	درصد تجزیه نفت خام	تست همولیزخون	تست CTAB
COD1-1	۲/۹۸ ± ۰/۸٤	۲/۱۷ ± ۰/٦٦	٥٤/۷۲ ± ٤/٤۸	-	+++
COD1-2	۳/۰٤ ± ۱/۹۲	۱/۸٤ ± ۰/٤٤	٥٤/۰٤ ± ٦/۲۹	-	-
COD1-3	۰/۷۲ ± ۰/۰٤	۱/۰۰ ± ۰/۲۸	۲۳/۷٦ ± ٥/٤۱	-	++
COD1-4	٦/٦۳ ± ۱/۲۹ [b]	٤/۰۰ ± ۰/۲۸	۸۸/۲٦ ± ۰/۷۱ [a]	-	-
COD1-5	۳/٤۳ ± ۰/۳۱	۳/٥۰ ± ۰/۲۸	۷٤/۹٥ ± ٦/۱۳	-	+++
COD1-6	۳/۰۱ ± ۰/۲۹	۲/٦۷ ± ۰/۳٤	۳۲/۷۲ ± ٦/۰۲	-	-
COD1-7	۲/۹٤ ± ۰/٥۸	۱/٥۰ ± ۰/۲۸	٤٥/٥٤ ± ٥/٤٤	++++[a]	-
COD2-1	۰/۹٦ ± ۰/۱۲	۲/۳۳ ± ۰/٤٤	٥٥/٦۰ ± ۳/۰٦	+++	-
COD2-2	۰/٤٤ ± ۰/۰۷	۱/۱۷ ± ۰/۱۷	۲۷/٥۰ ± ۲/۳٦	++++	++
COD2-3	۰/۱٦ ± ۰/۰۲	۰/۸٤ ± ۰/۱۷	٤۲/۸٦ ± ٤/۳۲	+++	-
COD3-1	۱/٥۱ ± ۰/۲٦	۳/۱۷ ± ۰/۹۳	٥۷/٦۳ ± ۷/٤۹	-	++++
COD3-2	۰/۷۹ ± ۰/۱٥	۲/٥۰ ± ۰/۲۹	۳۰/٤۳ ± ۳/۰٥	-	++++
COD3-3	۱/۸۸ ± ۰/۰۱	[a]٥/۰۰ ± ۰/۷٦	٤۹/۷۸ ± ٥/۹٥	-	-
COD3-4	۱/۷۳ ± ۰/۱۹	۲/۱۷ ± ۰/٦۰	٤٤/٦۸ ± ۱/۹۲	-	++
COD3-5	۰/۳۷ ± ۰/۰۹	۱/٥۰ ± ۰/٥۸	۱۳/۲۸ ± ۲/۸۳	-	-
COD4-1	۰/۲۳ ± ۰/۰۲	۰/٥۰ ± ۰/۰۰	۳۳/۹٤ ± ٥/٤۷	-	++++
COD4-2	۱۰/٤٦ ± ۰/٤۰ [a]	۳/۸٤ ± ۰/٤٤	٦٤/٦۳ ± ۷/٦٤	-	+++
COD4-3	۱۲/۱۸ ± ۱/۹٦ [a]	۲/۱۷ ± ۰/۱۷	٦٤/٦۹ ± ٥/۳۲	+++	+
COD4-4	۰/۲۱ ± ۰/۰۲	۰/۸۲ ± ۰/۱۷	٦/٤٤ ± ۳/۲۲	-	-
COD4-5	٤/۷۱ ± ۰/۸۷	٤/۸۳ ± ۰/۷۳ [ab]	٥۹/٥٤ ± ۲/۷۸	-	-
COD4-6	٦/٦٦ ± ۰/٦۰	۲/۳٤ ± ۰/۱۷	٥۳/٤۳ ± ٥/۹٥	-	-
COD5-1	۰/٥۲ ± ۰/۰۳	۱/۳٤ ± ۰/۱۷	۱۳/۷٥ ± ۲/۸۱	++	-
COD5-2	۰/۷۰ ± ۰/۰۳	۱/٥۰ ± ۰/۰۰	۲۹/۷۱ ± ٥/٤۰	++	+
COD5-3	۰/۰۹ ± ۰/۰۱	۰/٥۰ ± ۰/۰۰	۳۲/۰٦ ± ۳/٤٥	-	-
COD5-4	۰/۸٦ ± ۰/۰۳	۱/۸٤ ± ۰/۱۷	٤٥/۲۷ ± ٥/۳۱	-	-
COD5-5	۰/٥٥ ± ۰/۰۳	۱/٥۰ ± ۰/۰۰	۲۸/۷۱ ± ۲/۸٦	-	+
COD5-6	۲/۳۰ ± ۰/۱۷	۳/۱۷ ± ۰/٤٤	۷۷/٤٦ ± ۰/٤٦ [ab]	-	-
COD5-7	۰/٦٦ ± ۰/۰۷	۱/۱۷ ± ۰/۱۷	۱۱/٦۷ ± ۲/٥۱	+	+++

COD6-1	۳/۹۶ ± ۰/۹۵ b	۳/۳٤ ± ۰/٦٦	٥۲/٤۸ ± ٤/٥٦	+	++++
COD6-2	۰/۳٦ ± ۰/۰۳	۰/٦٦ ± ۰/۱۷	٦/٦۹ ± ۱/۱۱	-	++
COD6-3	٤/۹۱ ± ۰/۲٥	٤/۳۳ ± ۰/۸۳	٦٦/۳٦ ± ۷/۸٥	-	-
COD6-4	۳/۰٤ ± ۰/٤٤	۳/۱٤ ± ۰/٦۰	۳۲/٤۷ ± ٤/۰۲	+	+++
COD6-5	۳/۱۰ ± ۰/٤۰	۲/٥۰ ± ۰/۲۹	٤۰/۷۱ ± ۳/۹۰	+++	++
COD6-6	۰/۸٥ ± ۰/۳٥	۱/۳٤ ± ۰/۳٤	۱۲/٤٥ ± ۳/۸۸	-	++
COD6-7	۲/۱۸ ± ۰/٥۹	۲/۳٤ ± ۰/۱۱	۱۸/۲۸ ± ٥/۱٤	++++	++++
COD7-1	٥/٤٦ ± ۱/۰٦	۲/٥۰ ± ۰/۲۹	٥۱/۹۲ ± ٦/۱٥	-	++
COD7-2	۰/٤۹ ± ۰/۰۳	۱/۰۰ ± ۰/۲۹	۳٥/۳۸ ± ۳/۱٥	-	+
COD7-3	۱/۷۷ ± ۰/۱٤	۳/۳٤ ± ۰/٤٤	٦۲/۹۰ ± ۲/۱٥	-	-
COD8-1	۰/۸۷ ± ۰/۱۷	۲/۰۰ ± ۰/۲۹	٥۰/۰۳ ± ٥/٦٤	++	-
COD8-2	۰/۹۹ ± ۰/۱۱	۲/۰۰ ± ۰/۰۰	۲۸/۱۷ ± ٤/۳۰	+++	+++
COD9-1	۱/۸٤ ± ۰/۲٤	۳/۰۰ ± ۰/٥۷	۳۸/۹۸ ± ۳/٤۹	-	++
COD9-2	۰/۹۷ ± ۰/۰۹	۲/۱٦ ± ۰/۳٤	٤٥/۰۰ ± ۰/۸۰	-	++
COD9-3	۷/۱۰ ± ۰/۷۳ b	۲/٦٦ ± ۰/٤٤	٦۹/۸۹ ± ٦/٥۰	+++	++++
COD9-4	۱/۸۱ ± ۰/۱۰	۲/۸٤ ± ۰/۳٤	٦۸/۸۲ ± ٦/۸۸	-	+
LSD	۰/۰۷	۰/۱٤	۰/٦۷		

علامت ++++ (هاله خیلی بزرگ)، +++ (هاله بزرگ)، ++ (هاله متوسط)، + (هاله کوچک)، - (عدم حضور هاله).لازم به توضیح است که ODها به دلیل غلظت بالای نمونه ها ده برابر رقیق شده اند و سپس OD قرائت شده ضربدر ۱۰ گردیده است. مقادیر a و b مقایسه میانگین می باشند.

جدول ۲ – مقادیر درصد تجزیه نفت خام، OD باکتری در تیمارهای نفت خام، استایرن، آنتراسن و نفتای سنگین و نتایج تست تولید بیوسوفکتانت

جدایه‌های منتخب باکتریایی	درصد تجزیه نفت خام	OD تیمار نفت خام	OD تیمار استایرن	OD تیمار آنتراسن	OD تیمار نفتای سنگین	تست تولید بیوسورفاکتانت
Stenotrophomonas acidaminiphila COD 1-1	٥٤/۷۲ ± ٤/٤۸	۲/۹۸ ± ۰/۸٤	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۱.	۰/٤۷ ± ۰/۰۲	+++
Psedochrobactrum sp. COD1-4	۸۸/۲٦ ± ۰/۷۱ a	٦/٦۳ ± ۱/۲۹ b	۰/۰۸ ± ۰/۰۱	۰/۰۲٤ ± ۰/۰۰	۰/٦۳ a± ۰/۰٤	-
Shewanella sp. COD2-1	٥٥/٦۰ ± ۳/۰٦	۰/۹٦ ± ۰/۱۲	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/٤۲ ± ۰/۰۰	۰/٥۳ ± ۰/۰۱	+++
Arthrobacter sp. COD 2-3	٤۲/۸٦ ± ٤/۳۲	۰/۱٦ ± ۰/۰۲	۰/۱۲ a ± ۰/۰۱	۰/۱٤۸ a ± ۰/۰۲	۰/٥۱ ± ۰/۰۳	+++
Stenotrophomonas nitritireducens COD 5-6	۷۷/٤٦ ± ۰/٤٦	۲/۳۰ ± ۰/۱۷	۰/۱۱ ± ۰/۰۲	۰/۰۳٥ ± ۰/۰۰	۰/۳٥ ± ۰/۰۲	-

بدلیل کمتر بودن غلظت این آلاینده‌ها در فاز محلول بدلیل حلالیت پایین آنها و عدم فراهمی آنها برای تجزیه زیستی باشد (یانگ و همکاران ۲۰۱۱). سورفکتانت‌ها ممکن است از نوع شیمیایی یا زیستی – باشند و منجر به افزایش امولسیون شوندگی هیدروکربنی و دسترسی زیستی آنها برای میکروب‌ها می‌شوند (لینگلی و هونگچن ۲۰۰۹). یکی از ویژگی‌های بارز باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها توانایی امولسیون کنندگی آنها در محلول از طریق تولید عامل فعال سطحی[10] همانند سورفکتانت‌های زیستی[11] می–

[10] Surface–active agents
[11] Biosurfactant

باشد. سورفاکتانت‌های زیستی به طور مستقیم در فرایند حذف هیدروکربن از طریق افزایش دسترسی زیستی و تجزیه زیستی آنها دخالت دارند (گانش و لاین ۲۰۰۹؛ لینگلی و همکاران ۲۰۰۹).

انتخاب و شناسایی جدایه های کارآمد تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی

کاراترین جدایه‌ها که دارای چگالی نوری (OD)، بیومس میکروبی و درصد تجزیه نفت خام و ترکیبات PAH بالایی بودند و به تست‌های تولید بیوسورفاکتانت پاسخ مثبت دادند شامل ۱۰ جدایه COD2-1 ، COD1-5، COD4-3، COD4-2، COD9-3، COD6-3، COD7-1، COD3-1، COD1-1 و COD8-1 بودند. دیگر جدایه‌های کارای تجزیه نفتی که دارایOD، بیومس میکروبی و درصد تجزیه نفتی بالایی بودند ولی توانایی تولید بیوسورفاکتانت نداشتند شامل ۱۰ جدایه COD1-4، COD5-6، COD4-5، COD7-3، COD4-6، COD6-1، COD6-4، COD2-3، COD8-2 و COD3-3 بودند (شکل ٤).

نتیجه‌گیری کلی

از میان باکتریهای شناسایی شده و با توجه به نتایج ارزیابی حذف زیستی ترکیبات نفتی و دیگر شاخصه‌های کمی و کیفی، در نهایت ٥ باکتری برتر برای انجام تیمارهای زیست پالایی و گیاه پالایی معرفی می‌شوند که این باکتریها شامل COD 1-1 *Stenotrophomonas acidaminiphila*، COD1-4 *Psedochrobactrum sp.*، COD2-1 *Shewanella sp.*، COD 2-3 *Arthrobacter sp.* و COD 5-6 *Stenotrophomonas nitritireducens* می‌باشند (جدول ۲).

منابع مورد استفاده

Abou-Shanab RA, Eraky M, Haddad AM, Abdel-Gaffar AB and Salem AM, 2016. Characterization of crude oil degrading bacteria isolated from contaminated soils surrounding gas stations. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 97(5): 684-688.

Agamuthu P, Tan YS and Fauziah SH, 2013. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. Procedia Environmental Sciences 18: 694 – 702.

Arabjafari M, Fallah N, Dadvar M and Nasernejad B, 2017. Kinetic modeling of styrene biodegradation by *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767: Effect of adaptation to styrene and initial biomass concentration. Chemical Engineering Communications 204(2): 182-189.

Arulazhagan P, Vasudevan N and Yeom IT, 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. International Journal of Environmental Science and Technology 7(4): 639-652.

Chandankerea R, Yaoa J, Choic MMF, Masakoralaa DK and Chana Y, 2013. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. Biochemical Engineering 74: 46– 53.

Das K and Mukherjee AK, 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology 98: 1339–1345.

De la Fuente C, Clemente R, Martinez-Alcala I, Tortosa G and Bernal M P, 2011. Impact of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation; microbial biomass and plant uptake. Journal of Hazardous Material 186:1283-1289.

Ebrahimi M, Fallah AR and Sarikhani MR, 2013. Isolation and identification of some of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soils and evaluation of their growth potential in the presence of diesel. Water and Soil Science-University of Tabriz 1(1): 109-121. (In Persian with English abstract)

Ebrahimi M, Sarikhani MR and Fallah A, 2012. Assessment of biodegradation efficiency of some isolated bacteria from oil contaminated sites in solid and liquid media containing oil-compounds. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(1): 138-147.

Galkiewicz JP and Kellogg CHA, 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. Applied and Environmental Microbiology 74(24): 7828–7831.

Ganesh A and Lin J, 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram- positive isolation bacteria. African Journal of Biotechnology 8(21): 5847-5854.

Greer CW, Whyte LG and Niederberger TD, 2010. Microbial communities in hydrocarbon-contaminated temperate, tropical, alpine, and polar soils Pp. 2313-2328. In: Timmis KN (ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg.

Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS and Umar S, 2013. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. International Biodeterioration and Biodegradation 81: 28-34.

Liangli J and Hungchen B, 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials 2: 76-94.

Mao-Cheng Deng M CH, Li J, Liang FR, Yi MI, Xu XM, Yuan JP, Peng J, Wu CHF and Wang JH, 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 Bulletin 83: 79–86.

Mao J, Luo Y, Teng Y and Li Z, 2012. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. International Biodeterioration & Biodegradation 70: 141-147.

Mao Zh, Yu Ch and Xin L, 2015. Enhancement of phenol biodegradation by *Pseudochrobactrum* sp. through ultraviolet-induced mutation. International Journal of Molecular Sciences 16: 7320-7333.

Meenu Tyagi M, da Fonseca MR and de Carvalho CCCR, 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation 22(2): 231-41.

Maiti A and Bhattacharyya N, 2012. Biochemical characteristics of a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from an oil refinery site of west Bengal, India. Advances in Life Science and its Applications (ALSA) 1(3): 48-53.

Sadighbayan Kh, Mazaheri Assadi M, Farazmand A, Monadi AR and Aliasgharzad N, 2017. Investigation of biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbon with bacteria isolated from Tabriz City and Petroleum Refinery soils. Water and Soil Science-University of Tabriz 27(4): 149-158. (In Persian with English abstract)

Sannino F, Nuzzo A, Ventorino V, Pepe O and Piccolo A, 2016. Effective degradation of organic pollutants in aqueous media by microbial strains isolated from soil of a contaminated industrial site. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 3: 2-7.

Tandy S, Healey JR, Nason MA, Williamson JC and Jones DL, 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. Environmental Pollutants 157: 690–697.

Wolicka D, Suszek A, Borkowski A and Bielecka A, 2009. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Bioresource Technology 100: 3221-3227.

Wu JH, Wu FY, Chuang HP, Chen WY, Huang H J, Chen SH and Liu WT, 2013. Community and proteomic analysis of methanogenic consortia degrading terephthalate. Applied and Environmental Microbiology 79(1):105–112.

Yang Y, Zhang N, Xue M, Lu ST and Tao S, 2011. Effects of soil organic matter on the development of the microbial polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation potentials. Environmental Pollution 159(2): 591–595.

Yu Z, Zeng GM, Chen YN, Zhang JC, Yu Y, Li H, Liu ZF and Tang L, 2011. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. Process Biochemistry 46: 1285–1291.

Zafra G, Absalón AE, Carmen Cuevas MD and Cortés-Espinosa DV, 2014. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. Water, Air and Soil Pollution 225:1826- 1844.