بررسی اثر کاهش سمیت آلودگی نفتی توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام همزیست با شکم‌پا جداسازی شده از خلیج فارس بر روی کیفیت محصولات غذایی دریایی

نسرین انصاری[۱]، فرخ رخ‌بخش زمین[۲]، مهدی حسن شاهیان*[۳]، مجید عسکری حصنی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: mshahi@uk.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۲۷

چکیده

خلیج فارس مهمترین محیط دریایی در جهان است. زیرا سالانه حدود ۲۵۰۰۰ تانکر انتقال نفت در این خلیج فارس انجام می‌شود و نشت و آلودگی نفت در این منطقه بسیار زیاد است. رابطه بین جانوران دریایی و باکتری‌های تجزیه‌کننده به خوبی درک نشده است. هدف از این مطالعه توصیف باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام همزیست در شکم‌پایان خلیج فارس است. این جانداران دریایی از جزیره خارک در خلیج فارس جمع‌آوری شدند. باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام همزیست پس از ۴ دوره کشت با استفاده از غنی‌سازی در محیط ONR7a از جانداران جمع‌آوری شده جدا شدند. باکتری‌های جدا شده با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. تجزیه نفت خام و اسپکتوفتومتری برای هر سویه تعیین شد. اثر کاهش سمیّت فلزات سنگین و مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی بر روی گوشت ماهی و میگو پرورشی توسط باکتری تجزیه‌کننده بررسی شد. در این مطالعه، ۲ سویه تجزیه-کننده نفت خام IAUK3585 و IAUK3586 از نمونه شکم‌پا جداسازی شد. این سویه‌ها مربوط به جنس و گونه *Thalassospira profundimaris* بودند و سویه IAUK3586 بیشترین میزان تجزیه نفت خام را داشت. نتایج حاصل از اثر کاهش سمیّت فلزات سنگین و مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی ثابت کرد که مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی و فلزات سنگین در حوضچه با باکتری تجزیه‌کننده در مقایسه با حوضچه بدون باکتری تجزیه‌کننده و واجد آلودگی نفتی و حوضچه بدون هیچ یک از این شرایط بطور قابل‌توجهی کاهش داشت. این نتیجه ثابت می‌کند که باکتری تجزیه‌کننده همزیست با شکم پا اثر قابل‌توجهی روی افزایش کیفیت گوشت ماهی و میگو دارد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه بیولوژیکی، محیط زیست دریایی، آلودگی، نفت خام، خلیج فارس، شکم‌پا

مقدمه

نفت خام یک منبع انرژی عمده در سراسر جهان است و ترکیبی پیچیده از انواع گسترده‌ای از ترکیبات مختلف از جمله آلکان‌های طبیعی(n-alkanes)، آلکین‌های سیکلیک (c-alkanes)، هیدروکربن‌های چند شاخه‌ای پلی‌آروماتیک‌ها (PAHs) و ترکیبات غیرهیدروکربنی است. انتشار هیدروکربن‌ها در محیط زیست، به طور تصادفی یا به علت فعالیت‌های انسانی، عامل اصلی آلودگی آب و خاک می‌باشد. آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی تهدیدی جدی برای اکوسیستم‌های زمینی و دریایی، گردشگری و فعالیت‌های تفریحی است (۱، ۲). روش‌های امروز برای رهایی از آلودگی نفتی در محیط زیست شامل جمع‌آوری مکانیکی، استفاده از مواد صیقلی، غرق شدن، سوختن، پراکندگی و غیره می‌باشند که همه آنها پیامدهای محیط زیست نامطلوب دارند. تجزیه میکروبی مکانیسم اصلی و نهایی طبیعی است که می‌تواند آلاینده-های PHC را از محیط پاکسازی کند با این حال هر نوع سویه معمولاً با توانایی استفاده از چند نوع هیدروکربن (HCs) مشخص می‌شود (۳، ۴). برای مثال، مخمرها فقط

می‌توانند هیدروکسید آلیفاتیک را اکسید کنند. گونه‌های باکتریایی مانند *اسینتوباکتر*، *آرتروباکتر*، *باسیلوس*، *کورینه باکتریوم*، *فلاووباکتریوم*، *ویبریو* و *سودوموناس* دارای گونه‌هایی هستند که با هم می‌توانند اکثر اجزای نفت خام شامل آلیفاتیک، آلیسیکلیک[1]، آروماتیک و HCs را تجزیه کنند. واضح است که آنزیم‌های لازم مورد نیاز را نمی‌توان در یک ارگانیسم یافت. بنابراین، برای تجزیه کامل آلاینده‌های نفتی، یک کشت ترکیبی از جامعه میکروبی مورد نیاز است (۵). در یک فرآیند بیولوژیکی، میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از هیدروکربن به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده کنند و به جای انباشت آنها در مرحله دیگری، تجزیه شوند. درمان بیولوژیکی می‌تواند مزایای بیشتری نسبت به سیستم‌های فیزیکی و شیمیایی در حذف نشت‌ها داشته باشد و یکی از اساسی‌ترین و قابل اطمینان‌ترین مکانیسم‌ها برای از بین بردن آلودگی نفت خام از محیط زیست است زیرا باعث تجزیه بیولوژیکی قطعات نفتی توسط میکروارگانیسم‌ها و جایگزین "سبز" برای درمان آلودگی‌های خطرناک به دلیل عدم اثرات زیست محیطی آن است و همچنین ارزان‌تر از روش‌های دیگر و راندمان بالای آن می‌باشد (۶).

یکی از مهمترین ویژگی‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن، توانایی امولسیون هیدروکربن‌ها در محلول با تولید مواد فعال سطحی است که باعث پراکندگی هیدروکربن‌ها در امولسیون‌های آب، میکرو قطرات یا میسل‌ها می‌شوند که بعداً به سلول منتقل می‌شود. تجزیه میکروبی آلودگی نفت تحت تأثیر عوامل محیطی بسیاری از جمله دما، ترکیب نفت ترکیب خاک نسبت منابع کربن، نیتروژن و فسفر سورفکتانت‌ها گونه‌های میکروبی، pH و غلظت نمک است. دما بر رشد میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد و همچنین فعالیت آنزیمی و فرم فیزیکی نفت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ویسکوزیته نفت در دماهای پایین افزایش می‌یابد که منجر به افت شدید میزان پراکندگی نفت می‌شود. علاوه بر این، میکرودرم تماس بین باکتری‌ها و نفت را کاهش می‌دهد و کاهش نوسان و حلالیت نفت به طور مستقیم بر روی سمیت بیولوژیکی برخی از هیدروکربن‌های نفت تاثیر می‌گذارد (۸-۶).

نرم‌تنان اعماق دریا به طور مستقیم از رسوبات تازه ته‌نشین شده تغذیه و زندگی می‌کنند بنابراین، در تماس مستقیم با آلوده کننده وارد شده به آب هستند و از طرفی با واسطه معلق خواری با باکتری‌های جمع شده در رسوبات آلوده شوند. در واقع، حجم زیادی از آب را برای تأمین مواد غذایی مورد نیازشان فیلتر و اجزای محلول نفتی و ذرات حاوی هیدروکربن‌های موجود در ستون آب‌های آلوده به نفت را جمع‌آوری می‌کنند. همچنین، ممکن است روی باکتریوپلانکتون‌ها تأثیر گذارند. شکم‌پایان از جمله موجوداتی هستند که باکتری‌ها در آبشش آن‌ها حضور دارند و ترکیبات کاهش یافته مانند هیدروژن سولفید را متابولیزه کرده و کربن غیرآلی را به کربن آلی تثبیت می‌کنند که ممکن است به وسیله میزبان استفاده شود (۱۱-۹).

مطالعاتی که در خصوص آلودگی نفتی خلیج فارس و باکتری‌های تجزیه‌کننده صورت گرفته است مرتبط با میکروارگانیسم‌های آزادزی بوده (۱۲) و تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه بر روی باکتری‌های همراه موجودات خلیج فارس صورت نگرفته است. روزبهانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ تاثیر بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری *سودوموناس*[2] را در آب‌های آلوده به نفت خام، در خلیج فارس بررسی کردند و تأثیر عواملی مثل شوری، غلظت بیوسورفکتانت، عوامل مغذی مثل نیترات و فسفر و pH را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها میزان نفت را قبل و بعد از افزودن سورفاکتانت شیمیایی بررسی کردند که نتایج مشخص نمود افزودن سورفکتانت موجب افزایش تجزیه زیستی می‌شود (۱۳). حسن شاهیان و همکاران در سال ۲۰۱۴ تعداد ۱۲ باکتری تجزیه‌کننده نفت خام را از مناطق آلوده در خلیج فارس جداسازی کردند و بر اساس دو عامل رشد روی نفت خام و تجزیه هیدروکربن غربالگری کردند. از بین آنها سویه Z-PG، متعلق به جنس *Corynebacterium variabile*، قادر به تجزیه ۶۲ درصد از نفت خام بعد از یک هفته کشت در محیط

[1] Alicyclic

[2] *Pseudomonas* sp.

ONR7a بود. این سویه فعالیت امولسیون‌کنندگی و تولید بیوسورفاکتانت بالا در بین همه سویه‌های جدا شده داشت و کروماتوگرافی گازی برای این سویه نشان داد که بیشتر پیک‌ها در قسمت آلکان‌ها به طور جدی توسط این سویه کاهش یافته بود (۱۴). در این تحقیق، سویه‌های باکتریایی همراه با اسفنج بومی خلیج فارس با توانایی تصفیه زیستی نفت خام، جداسازی و خالص‌سازی شده و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفته‌اند.

هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام همزیست در برخی شکم‌پایان خلیج فارس، بر روی کیفیت محصولات غذایی دریایی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام، نمونه آب دریا و شکم‌پا از عمق ۱۵ سانتی‌متری و نیز از مناطق ساحلی جزیره خارک در زمان مهر ۱۳۹۹ (اکتبر ۲۰۲۰) که احتمال حضور نفت وجود داشت از عمق ۱۰ الی ۱۵ متری به وسیله غواصی در ظروف استریل جمع‌آوری و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام آنالیزهای بعدی قرار داده شدند.

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها درنمونه شکم‌پا، رسوبات، آب با روش سریال رقت[1] (CFU)

برای شمارش باکتری‌های همراه با شکم‌پا، جانور شکم پا تحت شرایط استریل با چاقو باز شد. سپس سطح داخلی آنها با استفاده از بافر فسفات شستشو داده شد و ۱ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده درون لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب دریای استریل منتقل گردید. برای نمونه‌های آب نیز به همین ترتیب یک میلی‌لیتر آب دریا به ۹ میلی‌لیتر بافر استریل منتقل شد. برای شمارش هتروتروف‌ها در نمونه‌های آب و شکم پا رقت 10^{-2}، در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های مارین آگار کشت چمنی داده شد. برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها از محیط کشت ONR آگار به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. بدین‌صورت که ۱۰۰ میکرولیتر رقت 10^{-1} از سوسپانسیون بدست آمده بر روی پلیت‌های ONR حاوی ۱٪ نفت کشت سفره‌ای داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد شمارش کلنی‌ها انجام شد و سپس تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر محاسبه شد (۹).

ترکیبات محیط ONR در یک لیتر به شرح زیر است : محلول اول شامل سدیم کلرید (۴۰ گرم)، سدیم سولفات (۳/۸ گرم)، سدیم بی‌کربنات (۰/۰۳۱ گرم)، پتاسیم کلرید (۰/۷۲ گرم)، سدیم برمید (۰/۰۸۳گرم)، سدیم فلورید (۰/۰۰۲۶ گرم)، سدیم مونوفسفات (۰/۰۸۹ گرم)، اسید بوریک (۰/۲۷ گرم)، آمونیوم کلرید (۰/۲۷ گرم) و محلول دوم شامل کلسیم کلرید (۱/۴۶ گرم)، منیزیم کلرید (۱۱/۱۸ گرم)، استرانسیوم کلرید (۰/۰۲۴ گرم)، آهن کلرید (۰/۰۰۲گرم)، تریس (۱/۳ گرم) می‌باشد. اسیدیته محلول در ۷/۶ تنظیم شد.

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها با روش MPN[2]

ابتدا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون آماده شده و نمونه آب برداشته و به درون لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب دریای استریل منتقل و رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} تهیه شد. در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط مارین براث (محیط ONR و پپتون و مخمر) برای شمارش هتروتروف‌ها و ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط مارین براث حاوی نفت ۱٪، برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها تحت شرایط استریل ریخته و سپس رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} در

[1] Colony forming unit

[2] Most Probable Number

میکروپلیت‌های ۲۴ خانه تلقیح شد. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به صورت سه‌تایی انجام شد. میکروپلیت‌ها به منظور شمارش هتروتروف‌ها به مدت ۷ روز و میکروپلیت‌ها برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان مثبت برای آزمایش MPN به حساب آمد (۹، ۱۵).

تعداد MPN با استفاده از نرم‌افزار MPNcalculator نسخه ۲، ۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت

برای جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از محیط کشت اختصاصی ONR با ۱ درصد نفت خام استفاده شد. از نمونه‌های آب به میزان ۵ میلی‌لیتر و سوسپانسیون آماده ۵ میلی‌لیتر به داخل این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح گردید و سپس به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور 160 rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سه پاساژ متوالی کلنی‌ها روی محیط کشت مارین آگار خالص‌سازی شدند. سویه‌های باکتریایی که بیشترین چگالی نوری (OD) در ۶۰۰ نانومتر داشتند برای شناسایی غربالگری شدند (۱۶، ۱۷).

شناسایی باکتری‌های جدا شده

شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی باکتری‌های جدا شده از منابع فوق، از آزمایش‌های اولیه زیر رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل کلنی، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، (اکسایش / تخمیر F/O)، احیای نیترات، تولید H_2S، تولید اندول، تست TSI و تست همولیز استفاده گردید (۱۸).

شناسایی مولکولی

تکثیر PCR ژن‌های 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی باکتری (۱) و آغازگر معکوس (۲) انجام شد (۱۹، ۲۰).

(1): F(5-27AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)

(2): R(5-1492TACGYTACCTTGTTACGACTT-3)

برنامه PCR برای تکثیر ژن بدین‌صورت بود. دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ می‌باشد. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند 1400 bp از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شده و همولوژی آنها بررسی گردید و قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ گردید.

سنجش حذف نفت خام توسط باکتری‌های جدا شده

روش اسپکتروفتومتری

میزان حذف نفت خام به وسیله حل کردن مقدار نفت باقیمانده محیط کشت در دی‌کلرومتان و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد (۲۱).

(رابطه ۱)

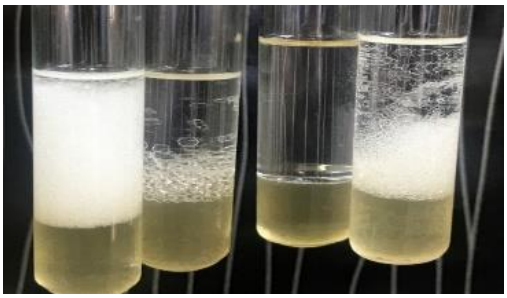
میزان جذب نمونه – میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت خام

۱۰۰× میزان جذب شاهد /

فعالیت امولسیوفیکاسیون (E_{24})

برای اندازه‌گیری شاخص امولسیون‌سازی، باکتری‌های تجزیه‌کننده ابتدا در محیط نوترینت براث به همراه ۴

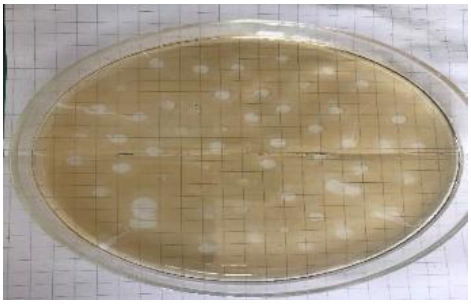
درصد نمک کشت داده شده و پس از رشد لگاریتمی باکتری‌ها، میزان ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بدست آمده درون لوله آزمایش ۱۶ سانتی حاوی ۶ میلی‌لیتر از نفت سفید استریل ریخته و به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا بوسیله ورتکس همزنی شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت فعالیت امولسیون‌کنندگی در مکان ثابت قرار گرفت، در پایان میزان فعالیت امولسیون‌کنندگی با اندازه‌گیری ارتفاع ناحیه امولسیون شده تقسیم بر ارتفاع کل مایع ضربدر ۱۰۰ بدست آمد (شکل ۱) (۲۲).



شکل ۱- فعالیت امولسیون‌کنندگی (E_{24}) و تولید بیوسورفکتانت

تست گسترش قطره (Oil Spreading)

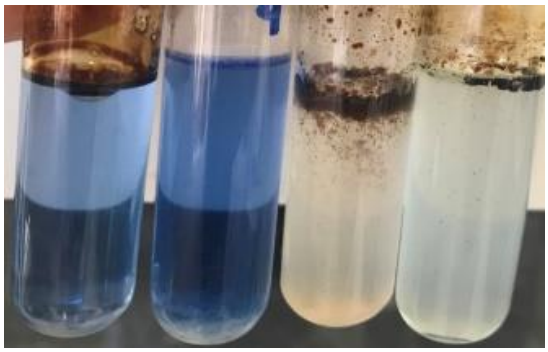
ابتدا درون پلیت‌های شیشه‌ای ۱۰ سانتی مقداری آب ریخته سپس بر روی آن ۳ قطره نفت خام ریخته تا لایه‌ای نازک تشکیل شود، میزان یک قطره از سوسپانسیون تهیه شده از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت که در محیط کشت نوترینت براث به همراه ۴ درصد نمک کشت داده شده بود به وسیله سمپلر از بالا بر روی آن ریخته سپس با خط‌کش میزان پراکندگی به دست آمده اندازه‌گیری شد (شکل ۲).



شکل ۲- تست گسترش قطره به منظور اندازه‌گیری میزان تجزیه نفت

تست رنگ (DCPIP[1])

برای مشاهده تست رنگ ابتدا پری کالچر برای سویه‌های انتخابی انجام شد، بعد از به وجود آمدن کدورت کافی هر نمونه سانتریفیوژ شد سپس مایع رویی آن کاملاً برداشته شده و فقط رسوب باقی‌مانده با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حل شد. درون لوله آزمایش به میزان ۷ سی‌سی محیط کشت ONR و میزان ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بدست آمده و ۴۰ میکرولیتر از رنگ دی‌کلروفنل اندوفنل که از قبل ۲۰ میلی‌گرم به همراه ۲۰ سی‌سی آب مقطر رقیق شده بود و سپس ۵۰ میکرولیتر نفت خام به آن اضافه شد. برای کنترل دو لوله به عنوان شاهد در نظر گرفته شد لوله C_1 که به میزان ۷/۵ سی‌سی محیط کشت ONR، ۴۰ میکرولیتر رنگ DCPIP و ۵۰ میکرولیتر نفت و لوله C_2 که به همان میزان محیط کشت و رنگ، ولی به جای نفت به میزان ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه شد سپس به مدت یک هفته در هر روز تغییر رنگ محیط (از آبی پر رنگ به کاملا بی‌رنگ) (شکل ۳) در هر لوله گزارش شد (۲۳، ۲۴).



شکل ۳- استفاده از DCPIP به عنوان نشانگر کاهش اکسیداسیون و تغییر رنگ از آبی به بی‌رنگ

اثر کاهش سمیت آلودگی نفتی بر روی میگو و ماهی‌های پرورشی دریایی

باکتری برتر تجزیه‌کننده نفت خام جداسازی شده از شکم‌پا به حوضچه پرورش ماهی و میگو دریایی اضافه شد.

[1] 2,6 Dicholorophenol Indophenol

به این حوضچه مقدار ۰/۱ گرم بر لیتر نفت خام بعنوان آلوده‌کننده اضافه شد. در حوضچه دیگر آلودگی نفتی القاء شد اما باکتری تجزیه‌کننده اضافه نشد. در یک حوضچه دیگر هم حالت معمول پرورش ماهی و میگو بود که نه باکتری و نه القای آلودگی نداشت. سپس ماهی و میگو پرورش یافت میزان فلزات سنگین و کل هیدروکربن‌های نفتی در بافت آنها با روش جرم‌سنجی اتمی و گاز کروماتوگرافی سنجش گردید (۲۳).

نتایج

شناسایی شکم‌پا

نمونه‌های جمع‌آوری شده طبق کلید شناسایی بیوسیستماتیک جانوری مورد شناسایی قرار گرفت، نمونه شکم‌پا مربوط به جنس *Nerita* sp. بود. تصویر ماکروسکوپی نمونه جمع‌آوری شده در شکل ۴ آمده است.

شکل ۴- تصویر ماکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده

نتایج حاصل از تعداد کل هتروتروف و تجزیه‌کننده با روش سریال رقت

برای شمارش تعداد کل باکتری‌های هتروتروف از محیط کشت مارین آگار استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر رقت 10^{-2} و رقت 10^{-3} بر روی محیط کشت مارین آگار کشت سفره‌ای داده شد و تعداد کلنی‌های هر پلیت مورد شمارش قرار گرفت. برای شمارش تعداد کل باکتری‌های تجزیه‌کننده از محیط کشت ONR به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. بدین‌صورت که ۱۰۰ میکرولیتر رقت 10^{-1} و رقت 10^{-2} بر روی محیط کشت ONR نفت کشت سفره‌ای داده شد و تعداد کلنی‌های هر پلیت مورد شمارش قرار گرفت. تعداد کل هتروتروف‌ها به میزان $1/2\times10^{6}$ و تعداد کل تجزیه-کننده‌ها $2/10\times10^{6}$ بود.

نتایج حاصل از MPN باکتری‌های هتروتروف و تعداد تجزیه‌کننده‌ها

برای شمارش MPN کل نمونه‌های هتروتروف‌های از محیط MB و تجزیه‌کننده‌ها از محیط ONR استفاده شد. منبع مورد استفاده برای تجزیه‌کننده‌ها نفت خام بود. رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-1} از سوسپانسیون باکتریایی با سه بار تکرار بر روی میکروپلیت ۲۴ خانه تلقیح شد. ایجاد کدورت در رقت‌های تهیه شده به عنوان اندیکاتور MPN استفاده شد. نتایج حاصل از MPN در ۱۰۰ میکرولیتر نمونه محلول به میزان $1/50\times10^{6}$ برای هتروتروف‌ها و $1/00\times10^{5}$ برای تجزیه‌کننده‌ها بود.

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ی نفت خام

در این تحقیق دو سویه از نمونه شکم‌پا جداسازی شد. سویه‌های جداسازی شده در محیط ONR به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. در جدول ۱ خصوصیات این باکتری‌ها آمده است.

جدول ۱- خصوصیت سویه‌های جداسازی شده

سویه (IAUK)	۳۵۸۵	۳۵۸۶
شکل کلنی	متوسط زرد	ریز قطره آبی
رنگ‌آمیزی گرم	کوکوباسیل+	باسیل-
تست کیفی رشد	-	میکرو برتر+++
تست کمی رشد	۰/۱۷۸	۱/۱۵۰
تست همولیز cm	۱/۵	-
گسترش قطره	۰/۳	۰/۵
امولسیون‌کنندگی (E24)	۰	۰
منبع جداسازی	شکم‌پا خارک	شکم‌پا خارک

تست‌های غربالگری برای انتخاب سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام

باکتری‌های همزیست تجزیه‌کننده نفت خام در بافت-های جانوران دریایی پس از کشت‌های غنی‌سازی که به مدت دو هفته در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بودند، توسط برخی از آزمایش‌های غربالگری مانند تست همولیز، گسترش قطره، امولسیون‌کنندگی اختصاصی، آنالیز رشد در ارلن و حذف نفت و آزمایش دی‌کلروفنل اندوفنل (تست رنگ) برای انتخاب بهترین باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام بین سویه‌ها انجام شد. نتایج این غربالگری در جدول ۲ نشان داده شده است. توانایی باکتری‌های انتخاب شده برای تولید بیوسورفکتانت با کیفیت (گسترش قطره) و کمیت (همولیز بر روی آگار خون) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- خصوصیت سویه‌های جداسازی شده

سویه (IAUK)	۳۵۸۶
تست همولیز	-
گسترش قطره	۰/۵
آنالیز رشد در ارلن	۰/۷۶۸
آنالیز حذف نفت	۱/۳۸۵
نتایج کیفی حذف نفت	کدورت پایین، نفت بالا، بدون امولسیون++
اختصاصی E24	۰/۰۰
تست رنگ (DCPIP)	+
منبع جداسازی	جزیره خارک

شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی اولیه سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت، که در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که در این جدول نشان داده شده است سویه‌ها حرکت مثبت، اندول منفی و نیترات منفی بودند.

جدول ۳- شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های جدا شده

سویه (IAUK)	۳۵۸۵	۳۵۸۶
اکسیداز	+	+
کاتالاز	+	-
O/F	-/-	+/+
TSI	قلیا / قلیا	No ch..
حرکت	+	+
H_2S	-	-
اندول	-	-
احیاء نیترات	-	-
سیترات	-	-

شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی باکتری تجزیه‌کننده نفت با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rRNA با پرایمرهای ویژه این ژن انجام شد. سپس محصول ۱۴۰۰bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و جهت تعیین توالی فرستاده شد. توالی‌های حاصله در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸٪) به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید. توالی حاصله و بالاترین همسانی پس از بلاست کردن توالی بدست آمده در بانک‌های ژنی به همراه شماره دستیابی توالی این سویه در پایگاه NCBI[1] شرح داده می‌شود.

سویه IAUK3586

بالاترین همسانی این سویه پس از بلاست کردن با جنس و گونه *Thalassospira profundimaris* تطابق دارد. شماره دستیابی توالی این سویه در پایگاه NCBI، MT185148 می‌باشد. فیلوژنی این جنس در شکل ۵ نشان داده شده است.

سنجش فلزات سنگین و تعداد کل هیدروکربن‌های نفتی در بافت ماهی و میگو

نتایج حاصله از سنجش فلزات سنگین و مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی در جدول ۴ آمده است. همانطور که در این جدول دیده می‌شود در حوضچه‌ای که باکتری تجزیه‌کننده به میزان ۱×۱۰^{۶}CFU/ml اضافه شده بود کاهش فلزات سنگین در مقایسه با حوضچه‌ای که باکتری نداشت معنی‌دار بود. همچنین مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی در حوضچه با باکتری تجزیه‌کننده در مقایسه با دو حوضچه دیگر بطور قابل‌توجهی کاهش داشت. این نتیجه ثابت می‌کند که باکتری تجزیه‌کننده همزیست با شکم‌پا اثر قابل‌توجهی روی افزایش کیفیت گوشت ماهی و میگو دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات کمی در مورد ارتباط بین جانوران دریایی و میکروارگانیسم‌ها در محیط دریایی آلوده انجام شده است. موجودات دریای عمیق مستقیماً با رسوبات تازه ته‌نشین شده تغذیه می‌کنند. بنابراین، آنها با آلاینده‌های وارد شده به آب دریا در تماس مستقیم هستند و از سوی دیگر به علت فعالیت تغذیه فیلتر آن‌ها، با باکتری‌های انباشته شده

[1] National Center for Biotechnology Information

در رسوبات آلوده در ارتباط هستند (۲۵). حدود ۷۹ جنس باکتری شناسایی شده است که می‌تواند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کند، همچنین ۹ جنس *سیانوباکتر*، ۱۰۳ جنس قارچ و ۱۴ گونه جلبکی که می‌توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه یا تبدیل کنند، مشخص شدند (۲۶).

ادبوسوی[1] و همکاران گزارش دادند که تجزیه میکروبی هیدروکربن‌های نفتی در یک جریان گرمسیری آلوده در لاگوس نیجریه، ۹ سویه باکتریایی، *سودوموناس فلورسنس*[2]، *سودوموناس آئروژینوزا*[3]، *باسیلوس سوبتیلیس*[4]، جنس *باسیلوس*[5]، *آلکالیژنز*[6]، *اسینتوباکتر لووفی*[7]، فلاووباکتریوم[8]، *میکروکوکوس روسئوس*[9] و *کورینه باکتریوم*[10] از جریان آلوده جدا شد که می‌توانند نفت خام را کاهش دهند (۵).

کواترینی[11] و همکاران، (۲۰۰۸) برخی از باکتری‌های گرم مثبت را از آب دریای آلوده به هیدروکربن در دریای مدیترانه جدا کردند و معتقد بودند که باکتری‌ها باید مکانیسم خاصی برای تجزیه بسترهای هیدروکربن داشته باشند (۲۷).

مکناگتن[12] و همکاران، (۱۹۹۹) تأیید کردند که نشت نفت و آلاینده‌ها به اکوسیستم دریایی باعث تغییرات عمده‌ای در جوامع میکروبی می‌شود. در تحقیق حاضر، ۲ سویه تجزیه‌کننده نفت خام بوسیله سنجش‌های غربالگری از نمونه‌های شکم‌پا از جزیره خارک جداسازی شد و پس از شناسایی مولکولی مشخص شد که مربوط به جنس *Thalassospira* است (۲۸).

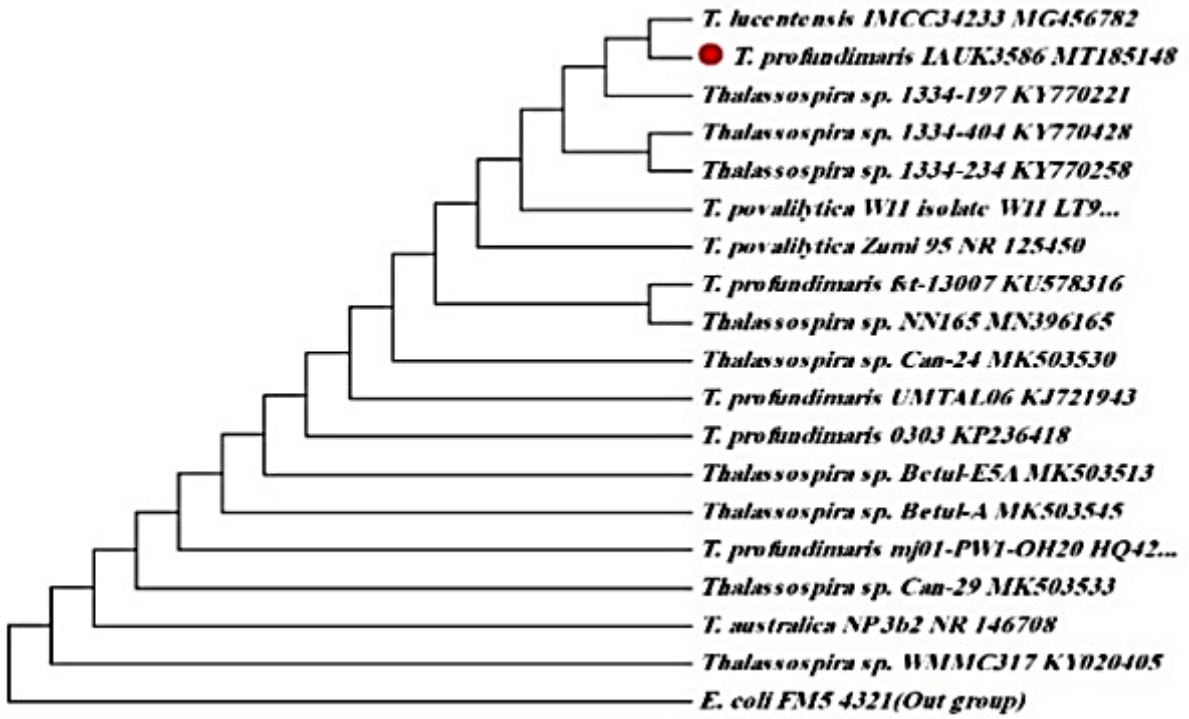
محققان مختلف از روش‌های مختلفی برای بررسی تجزیه و تحلیل تجزیه نفت خام توسط باکتری‌ها استفاده کرده‌اند (۶، ۲۷، ۳۱-۲۹). به عنوان مثال، چن[13] و همکاران برای تخمین تجزیه نفت خام توسط باکتری‌های آزاد و بی‌حرکت در محیط دریایی، از جذب اسپکتروفتومتری در ۴۲۰ نانومتر استفاده کردند. آنها نتیجه گرفتند که باکتری‌های بی‌حرکت کارایی بهتری برای تجزیه نفت خام در محیط دریایی دارند (۳۲).

در این تحقیق نیز ما از این روش برای ارزیابی تجزیه نفت خام استفاده کردیم. علی عبادی و همکارانش در سال ۲۰۱۷، ۵۴ سویه از دو خاک آلوده به نفت را جداسازی کردند که ۱۰ سویه از آن‌ها قادر به تولید بیوسورفکتانت و تجزیه نفت بودند. این تحقیق نشان داد که تولید بیوسورفکتانت یک ویژگی مهم در غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت است (۳۳، ۳۴). آید[14] و همکاران، (۲۰۱۵) گزارش دادند که بیوسورفکتانت تولید شده توسط *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس*[15] An6 بود جایگزین سورفکتانت‌های شیمیایی سنتز شده از آنجا که نشان داد بازده بالا برای حل شدن نفت دیزل (۷۱/۵۴ درصد در ۱ گرم در لیتر) که از SDS و Tween 80 بهتر بود و می‌توانست بهره‌وری تجزیه روغن دیزل از سویه An6 افزایش یابد (۳۵).

در این مطالعه، رابطه بین تولید بیوسورفکتانت و فعالیت امولسیون و تجزیه نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه گرفتیم که سویه‌هایی که فعالیت امولسیون بیشتری دارند، بیوسورفاکتانت بیشتری تولید می‌کنند و حداکثر تجزیه نفت را دارند. به گفته حسن شاهیان و همکاران، (۲۰۱۲) سویه‌هایی با فعالیت امولسیون بالا (E_{24}) نیز سطح بالایی از آبگریزی را نشان می‌دهند (۳۶) که نتایج ما با این تحقیق مطابقت دارد. جانوران دریایی خلیج فارس مانند شکم‌پایان به دلیل شرایط اکولوژیکی و موقعیت استراتژیکی که دارند، در برابر گرما، شوری و آلودگی‌های مختلف محیطی مقاوم هستند (۳۷). به نظر

[1] Adebusoye
[2] *Pseudomonas fluorescens*
[3] *P. aeruginosa*
[4] *Bacillus subtilis*
[5] *Bacillus* sp.
[6] *Alcaligenes* sp.
[7] *Acinetobacter lwo ffi*
[8] *Flavobacterium* sp.
[9] *Micrococcus roseus*
[10] *Corynebacterium* sp.
[11] Quatrini
[12] Macnaughton
[13] Chen
[14] Ayed
[15] *Bacillus amyloliquefaciens*

می‌رسد که خلیج فارس یک محیط بسیار غنی برای غربالگری و جداسازی انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها با کاربردهای متنوع است. نتایج این مطالعه نشان داد که جانداران دریایی از مناطق مختلف خلیج فارس دارای تراکم و تنوع بالایی از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام هستند و می‌توان از این باکتری‌ها برای تصفیه زیستی ایستگاه‌های آلوده در خلیج فارس استفاده کرد.



شکل ۵- فیلوژنی جنس *Thalassospira profundimaris* این درخت فیلوژنی توسط نرم‌افزار Mega4 رسم شده است و شباهت درخت فیلوژنی بر اساس نرم‌افزار محاسبه گردیده است و عدد بوت استارپ یک صدم است.

جدول ۴- نتایج حاصله از سنجش فلزات سنگین و مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی در حوضچه‌های مورد بررسی

حوضچه	فلزات سنگین (مس، جیوه، سرب)	مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی
۱: با باکتری تجزیه‌کننده	۴۰۰ppm	۱۰۰ mg/Kg
۲: با آلودگی نفتی و بدون باکتری	۸۰۰ppm	۳۰۰ mg/Kg
۳: بدون باکتری و آلودگی	۴۵۰ ppm	۱۵۰ mg/Kg

References

1-Adeleye A, Nkereuwem M, Omokhudu G, Amoo A, Shiaka G, Yerima M. Effect of microorganisms in the bioremediation of spent engine oil and petroleum related environmental pollution. Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 2018;22(2):157-167.

2-Brinkmann CM, Marker A, Kurtböke DI. An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. Diversity. 2017; 9(4):40.

3-Gregson BH, Metodieva G, Metodiev MV, McKew BA. Differential protein expression during growth on linear versus branched alkanes in the obligate marine hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2T. Environmental microbiology. 2019;21(7):2347-59.

4-Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnology research international. 2011;2011.

5-Adebusoye SA, Ilori MO, Amund OO, Teniola OD, Olatope S. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. World journal of Microbiology and Biotechnology. 2007; 23(8):1149-59.

6-Liu Y, Li C, Huang L, He Y, Zhao T, Han B, et al. Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test. Chinese journal of chemical engineering. 2017;25(12):1838-1846.

7-Rahman K, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource technology. 2002;85(3):257-61.

8-Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 211. 2011:63-120.

9-Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Mactra stultorum* collected from the Persian Gulf. Marine pollution bulletin. 2016;105(1):120-4.

10-Alex A, Silva V, Vasconcelos V, Antunes A. Evidence of unique and generalist microbes in distantly related sympatric intertidal marine sponges (Porifera: Demospongiae). PloS one. 2013;8(11):e80653.

11-Glasl B, Bourne DG, Frade PR, Webster NS. Establishing microbial baselines to identify indicators of coral reef health. Microbiology Australia. 2018;39(1):42-6.

12-Fakhrzadegan I, Hassanshahian M, Askari Hesni M, Saadatfar A. A study of crude oil-degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf. Marine Ecology. 2019;40(2):e12544.

13-Roozbehani B, Mirdrikvand M, Moqadam SI, Khalifeh A. Effect of *Pseudomonas* Bacteria Biosurfactants on Persian Gulf Crude Oil Water Contamination: Optimized Conditions of Effective Parameters. American Journal of Oil and Chemical Technologies. 2013;1:8-23.

14-Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Marine pollution bulletin. 2014;82(1-2):39-44.

15-Fuchsluger C, Preims M, Fritz I. Automated measurement and quantification of heterotrophic bacteria in water samples based on the MPN method. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2011;38(1):241-7.

16-Mehdi H, Giti E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation. 2008; 62(2):170-8.

17-Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong Y-h, Grimont P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research in microbiology. 2004;155(7):587-95.

18-Holt S, Kriey N, Sneath P. Bergy's Manual of Determinative tbr Bacteriology. New York: Williams and Wilkins; 1998.

19-Cappello S, Russo D, Santisi S, Calogero R, Gertler C, Crisafi F, et al. Presence of hydrocarbon-degrading bacteria in the gills of mussel *Mytilus galloprovincialis* in a contaminated environment: a mesoscale simulation study. Chemistry and Ecology. 2012;28(3):239-52.

20-Cappello S, Genovese M, Della Torre C, Crisari A, Hassanshahian M, Santisi S, et al. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS2003) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: A microcosm study. Marine pollution bulletin. 2012;64(12): 2820-8.

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

22-Batista S, Mounteer A, Amorim F, Totola M. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource technology. 2006;97 (6):868-75.

23-Peixoto FBS, da Cunha Peixoto JC, Motta DCL, Peixoto ATM, Pereira JO, Astolfi Filho S. Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2, 6 dichlorophenol indophenol. Acta Scientiarum Biological Sciences. 2018;40.

24-Hanson K, Desai JD, Desai AJ. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnology techniques. 1993;7(10): 745-8.

25-Freeman MF, Vagstad AL, Piel J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated 'Entotheonella' bacteria. Current opinion in chemical biology. 2016;31:8-14.

26-Neff JM. Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier; 2002.

27-Quatrini P, Scaglione G, De Pasquale C, Riela S, Puglia A. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. Journal of applied microbiology. 2008;104(1):251-9.

28-MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang Y-J, White DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and environmental microbiology. 1999;65(8):3566-74.

29-Kohno T, Sugimoto Y, Sei K, Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. Microbes and Environments. 2002;17(3):114-21.

30-Liu H, Yao J, Yuan Z, Shang Y, Chen H, Wang F, et al. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014;87:52-9.

31-Al-Dahash LM, Mahmoud HM. Harboring oil-degrading bacteria: a potential mechanism of adaptation and survival in corals inhabiting oil-contaminated reefs. Marine pollution bulletin. 2013;72(2): 364-74.

32-Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. PloS one. 2017;12(3):e0174445.

33-Ebadi A, Olamaee M, Sima NAK, Nasrabadi RG, Hashemi M. Isolation and characterization of biosurfactant producing and crude oil degrading bacteria from oil contaminated soils. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science. 2018;42(3): 1149-56.

34-Gargouri B, del Mar Contreras M, Ammar S, Segura-Carretero A, Bouaziz M. Biosurfactant production by the crude oil degrading *Stenotrophomonas* sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. Environmental Science and Pollution Research. 2017;24(4):3769-79.

35-Ayed HB, Jemil N, Maalej H, Bayoudh A, Hmidet N, Nasri M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. International Biodeterioration & Biodegradation. 2015;99: 8-14.

36-Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine pollution bulletin. 2012;64(1):7-12.

37-Luter HM, Whalan S, Andreakis N, Abdul Wahab M, Botté ES, Negri AP, et al. The effects of crude oil and dispersant on the larval sponge holobiont. Msystems. 2019;4(6):e00743-19.

Study The Effect of Reducing the Toxicity of Oil Pollution by Crude Oil-Degrading Bacteria Symbiotic with the Gastropod Isolated From the Persian Gulf on the Quality of Seafood

Nasrin Ansari[1], Farokh Rokhbakhsh-Zamin[2], Mehdi Hassanshahian[*3], Majid Askari Hesni[3]

1-PhD Student, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

3-Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* Corresponding Author: mshahi@uk.ac.ir

Received: 11/9/2021, Accepted: 18/9/2021

Abstract

The Persian Gulf is the most important marine environment in the world. Because annually about 25000 oil tankers transfer in this Gulf and oil spill and pollution are so much in this area. The relationship between marine animals and degrading bacteria not well understand. The aim of this study is the characterization of symbiont crude oil-degrading bacteria in some Gastropods in the Persian Gulf. Gastropods were collected from five stations at the Persian Gulf. Symbiont crude oil-degrading bacteria were isolated from collected Gastropod by enrichment in ONR7a medium after 4 subcultures. The isolated bacteria were identified by biochemical and molecular methods. The effect of reducing the toxicity of heavy metals and the total amount of petroleum hydrocarbons on farmed fish and shrimp meat was investigated by decomposing bacteria. The degradation of crude oil was determined by spectrophotometry methods for each strain. In this study, 2 crude oil-degrading bacteria IAUK3585, IAUK3586 were isolated from Gastropod. The efficient strain that had the *Thalassospira profundimaris* and strain IAUK3586 the efficient strain that had the highest crude oil degradation belonged to genera. The results of reducing the toxicity of heavy metals and the total amount of petroleum hydrocarbons proved that the total amount of petroleum hydrocarbons and heavy metals in the pond with decomposing bacteria compared to the pond without decomposing bacteria and oil contamination and the pond without any These conditions were significantly reduced. This result proves that the decomposing bacteria that coexist with the abdomen have a significant effect on increasing the quality of fish and shrimp meat.

Keywords: Biodegradation, Marine Environment, Pollution, Crude Oil Persian Gulf, Gastropod