مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۶۱-۱۴۸

Original Article

# بررسی تجزیه زیستی نفت خام توسط *آلکانی‌وروراکس دیزلولی*: سویه جداسازی شده از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس

**نرگس برومندی[۱]، محمد مهدی محمودی*[۲]، داریوش مولا[۳]، عباسعلی رضائیان[۴]، مسعود بوستانی[۵]**

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، [۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون [۳] استاد، دانشگاه شیراز، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی، [۴] مربی، گروه میکروب شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، [۵] کارشناس ارشد، سازمان منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس، عسلویه، بخش بهداشت- ایمنی و محیط زیست

## چکیده

*سابقه و هدف:* آلودگی‌های نفتی، یکی از مشکلات عمده تهدید کننده محیط زیست به شمار می روند. امروزه روش تجزیه زیستی با استفاده از باکتری‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن به دلیل مناسب بودن از لحاظ اقتصادی و زیست محیطی مورد توجه می باشد. *آلکانی‌وروراکس* به عنوان یک باکتری تجزیه کننده هیدروکربن در محیط های دریایی آلوده به نفت خام شناخته شده است. این مطالعه با هدف بررسی توانایی تجزیه زیستی نفت خام توسط *آلکانی‌وروراکس دیزلولی*، جداسازی شده از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس انجام شد.

*مواد و روش‌ها:* در این مطالعه بنیادی کاربردی، ابتدا عمل جداسازی و غنی سازی باکتری تجزیه کننده نفت از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس انجام گرفت. باکتری جداسازی شده، با روش شناسایی مولکولی مبتنی بر توالی 16S rRNA شناسایی گردید. توانایی تجزیه زیستی سویه جداسازی شده، در غلظت های مختلف نفت خام مورد بررسی قرار گرفت.

*یافته‌ها:* با استفاده از روش شناسایی مولکولی باکتری جداسازی شده به عنوان *آلکانی‌وروراکس دیزلولی شناسایی* گردید. این باکتری در مدت زمان کمتر از ۱ دقیقه به صورت پایدار قادر به متلاشی کردن قطرات نفت بود. نتایج نشان داد که در غلظت ۱، ۲/۵ و ۵ درصدی نفت خام، میزان تجزیه زیستی به ترتیب ۶۸/۳۷ ، ۶۷/۹۷ و ۱۳/۲ درصد می باشد.

*نتیجه‌گیری:* از آنجایی‌که جنس *آلکانی‌وروراکس*، یک باکتری بومی محیط های دریایی آلوده به هیدروکربن می‌باشد و توانایی آن در تجزیه زیستی نفت خام ثابت شده است، استفاده از این باکتری برای رفع آلودگی های نفتی پیشنهاد می گردد.

*واژگان کلیدی:* نفت خام، تجزیه زیستی، *آلکانی‌وروراکس دیزلولی*، خلیج فارس.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

## مقدمه

از زمانی که بشر استفاده از سوخت‌های فسیلی را آغاز نمود، آلودگی نفتی اقیانوس‌ها و محیط‌های ساحلی به عنوان یک مشکل مطرح شده است (۱ و ۲). به طور معمول، روش‌های فیزیکی رایج مانند دستگاه‌های شناور، کفه‌گیرها و جاذب‌ها قادر به جمع‌آوری بیش از ۱۰ تا ۱۵ درصد از نفت خام نشت یافته نیستند. استفاده از سورفاکتانت‌های شیمیایی نیز به عنوان عوامل پاکسازی کننده به علت اثرات سمی بر روی موجودات زنده دریایی در محیط‌های آلوده چندان مورد توجه نمی‌باشند (۳). پاکسازی زیستی بر این حقیقت استوار است که درصد زیادی از ترکیبات نفتی از طریق زیستی قابل تجزیه می‌باشند. در

*) آدرس برای مکاتبه: کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۷۷۰۴۴۸۰۰ پست الکترونیک: mmmahmoodi636@yahoo.com

حقیقت مهم ترین مکانیسم اصلاح و پاکسازی محیط، تجزیه زیستی می‌باشد (۴). تجزیه زیستی فرآیندی است که به طور طبیعی و در شرایط مناسب به وسیله میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده نفت که قادر به مصرف هیدروکربن‌های نفت خام به عنوان منبع کربن متابولیک می‌باشند، رخ می‌دهد (۵). میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن برای رشد و گسترش در محیط زیست‌های آلوده سازش یافته اند (۶). از میکروارگانیسم‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت می‌توان در فرآیندهای اصلاح زیستی و پاکسازی نفت نشت یافته در محیط زیست‌های آبی و خاکی بهره برد. بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات آمفی‌پاتیک زیستی هستند که توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها و کپک‌های قارچی مختلف تولید می‌شوند (۷). بیوسورفاکتانت‌ها با کاهش کشش سطحی در سطح مایعات حل نشدنی موجب افزایش حلالیت، جذب و در نتیجه تجزیه ترکیبات آب‌گریز و نامحلول آلی می گردند (۸).

عوامل متعددی تجزیه هیدروکربن را تحت تأثیر قرار می‌دهند که مهم‌ترین آن‌ها غلظت نفت می‌باشد (۴). غلظت‌های بالای هیدروکربن‌ها به وسیله محدودیت مواد مغذی و اکسیژن یا از طریق اثرات سمی اعمال شده توسط هیدروکربن‌های فرار می‌تواند از تجزیه زیستی ممانعت به عمل آورد (۹). تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها با توانایی تجزیه آلودگی های نفتی در محیط‌های خاکی و وابسته به آب شیرین و دریا توزیع شده‌اند (۱۰).

این باکتری‌ها شامل جنس‌های *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *ویبریو* (*Vibrio*)، *فلاووباکتریوم* (*Flavobacterium*)، *آلکانی‌وروراکس* (*Alcanivorax*)، *سیکلوکلاستیکوس* (*Cycloclasticus*)، *مارینوباکتر* (*Marinobacter*)، *نپتوموناس* (*Neptunomonas*)، *اولیفیلوس* (*Oleiphilus*)، *اولیسپیرا* (*Oleispira*) و *پلانوکوکوس* (*Planococcus*) می‌باشند. لیو (Liu) و همکاران در سال ۲۰۱۰ باکتری *آلکانی‌وروراکس دیزلولی* را از آب‌های آلوده به نفت دریای بوهای چین جداسازی نمودند (۱۱). یوشیکاوا (Yoshikawa) و همکاران در سال ۲۰۱۰ سویه‌ای از *آلکانی‌وروراکس* را از منطقه ساحلی جزیره گوییماراس واقع در فیلیپین جداسازی نمودند که قادر به تجزیه اجزای نفت خام سنگین بود (۱۲). اولین گزارش جداسازی *آلکانی‌وروراکس دیزلولی* از آب و رسوبات خلیج فارس در ایران توسط حسن شاهیان (Hasanshahian) و امتیازی (Emtiazi) در سال ۲۰۱۲ ارائه گردید (۱۳). هدف از انجام این مطالعه جداسازی جنس *آلکانی‌وروراکس* از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس و پتانسیل رشد و توان تجزیه زیستی نفت خام توسط آن بود.

## مواد و روش‌ها

*الف) نمونه‌گیری از رسوبات منطقه ساحلی خلیج فارس:* نمونه‌گیری رسوبات به صورت تصادفی در ۱۰ ایستگاه ساحلی انجام شد. از آنجایی که نمونه‌گیری به منظور جداسازی

شکل ۱: ایستگاه‌های نمونه گیری در منطقه ساحلی خلیج فارس

باکتری‌های هوازی صورت می گرفت، نمونه‌ها با استفاده از قاشقک استریل از سطح خاک تا عمق ۱۲ سانتی‌متری جمع آوری شدند. پس از اندازه گیری دمای نمونه ها در محل، به منظور انجام آزمایش های شیمیایی و میکروبی به آزمایشگاه انتقال داده شدند (۱۴) (شکل ۱).

در آزمایشگاه pH و میزان هدایت الکتریکی (electric conductivity) شیرابه سانتریفیوژ شده نمونه های خاک توسط دستگاه pH متر (Horiba D54) تعیین گردید. همچنین میزان شوری نمونه های خاک نیز بر اساس میزان هدایت الکتریکی محاسبه گردید (۱۵).

*ب) جداسازی و خالص سازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام:* برای این منظور از محیط سنتزی نمک‌های معدنی بوشنل هاس (Bushnell Hass Mineral Salts medium) با فرمولاسیون زیر استفاده شد:

در ابتدا ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (Merck)، ۱ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (Merck)، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم (Merck)، ۰/۰۲ گرم کلرید کلسیم (Merck)، ۱ گرم نیترات آمونیوم (Merck) و ۲ قطره کلرید آهن ۶۰ ٪ (Merck) به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد (۱۴). به منظور رشد باکتری‌های دریایی کلرید سدیم ۳٪ (Merck) به محیط کشت (pH محیط برابر ۷) اضافه گردید (۱۶).

بخش‌هایی از رسوبات (۱ گرم) به فلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط سنتزی تکمیل شده با ۱ درصد نفت خام، اضافه گردید. فلاسک ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور شیکر ۱۸۰ g گرماگذاری شدند. سپس ۵ میلی لیتر از آن به محیط سنتزی تازه منتقل و مجدداً به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. پس از ۲ کشت فرعی مجدد، از محتویات فلاسک نمونه‌برداری و بر روی محیط آگار بوشنل هاس کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، خالص‌سازی کلنی‌های متفاوت رشد کرده در سطح آگار از نظر ظاهری صورت پذیرفت (۱۴).

*ج) غربالگری باکتری‌های جدا شده بر اساس تولید بیوسورفکتانت:* در ابتدا تلقیح هایی از سویه های خالص شده به محیط سنتزی تکمیل شده با ۱ درصد نفت خام اضافه گردید و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه و دور شیکر ۱۸۰ g گرماگذاری شدند. سویه هایی که مایع کشت آنها در اثر رشد باکتری به طور کامل کدر شده و لایه نفت خام را به طور واضح از بین برده بودند، برای بررسی تولید بیوسورفکتانت انتخاب گردیدند. محیط کشت‌های مایع به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع شفاف به دست آمده، در آزمایش متلاشی شدن قطره نفت مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). به صورت اختصار، روش فروپاشی قطرات بر ناپایداری قطرات مایع به واسطه حضور سورفکتانت استوار است. در این روش قطرات شیرابه کشت میکروبی بر روی یک سطح جامد حاوی نفت قرار می‌گیرند. اگر مایع حاوی سورفکتانت نباشد مولکول‌های قطبی آب، سطح آب‌گریز را دفع کرده و قطرات پایدار می‌مانند. اگر مایع حاوی سورفکتانت باشد، قطرات پخش و یا حتی متلاشی خواهند شد. زیرا کشش سطحی بین قطرات مایع و سطح آب‌گریز کاهش می‌یابد (۱۷).

در این مطالعه به طور خلاصه قطراتی از شیرابه سانتریفیوژ شده هر ایزوله به سطح شیشه تمیزی که از قبل به نفت خام آغشته شده بود منتقل گردید. حضور بیوسورفکتانت با متلاشی شدن سریع قطره همراه بود. در حالی که قطراتی که حاوی بیوسورفکتانت نبودند ثابت باقی ماندند (۱۶). در ادامه غربال‌گری بر اساس مدت زمانی که قطرات نفت به صورت پایدار متلاشی گردید صورت گرفت (۱۸).

*د) شناسایی مولکولی:* سویه خالص‌سازی شده کارآمد بر اساس توان بالای باکتری در تولید بیوسورفکتانت و متلاشی کردن قطرات نفت انتخاب گردید. سپس DNA سویه خالص‌سازی شده، با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد. برای این منظور نمونه‌ها در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله در آب مقطر دو بار تقطیر به صورت سوسپانسیون درآمده و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل گردید و برای جوشاندن در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس در یک حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده

شد. پس از آن در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی (حاوی DNA) جمع آوری و در دمای انجماد برای انجام مراحل مولکولی نگهداری شد.

به منظور شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده، مقدار ۲ میکرولیتر از DNA الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). به منظور تکثیر نواحی بسیار متغیر V1 تا V3 ژن‌های *16S rRNA* باکتریایی از پرایمرهای عمومی شامل: 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) و 534R (5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′) استفاده گردید (۲۰). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (۲۰ mM Tris و ۵۰ mM KCL)، $MgCl_2$ (۲ mM)، پرایمر رفت و برگشت ۰/۱۲ µM، آنزیم Taq پلی‌مراز (۱ U)، dNTPs (۲۰۰ µM) و DNA الگو میزان ۳۰ نانوگرم انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

محصولات PCR به ژل آگاروز ۱٪ منتقل و الکتروفورز گردیدند. در ادامه این محصولات توسط کیت خالص‌سازی ژل AccuPrep® (BioneerInc، کره جنوبی) خالص‌سازی شدند (۲۱). به منظور شناسایی کامل باکتری جداسازی شده، محصول خالص‌شده PCR به وسیله شرکت Bioneer (کره جنوبی) تعیین توالی گردید.

توالی به دست آمده در بانک جهانی ژن NCBI بلاست گردید. با توجه به بلاست توالی به دست آمده و مقایسه آن با توالی‌های *16S rRNA* موجود در بانک جهانی ژن، بیشترین شباهت‌ها بررسی و باکتری مورد نظر تا حد گونه شناسایی گردید.

*ه) بررسی تجزیه زیستی غلظت‌های مختلف نفت خام توسط سویه جداسازی شده:* برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول باکتریایی (با غلظت $10^4$/ml باکتری) به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط سنتزی تکمیل شده با غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد نفت خام تلقیح گردید. این غلظت‌ها بر اساس میزان تقریبی آلاینده های هیدروکربنی در سواحل خلیج فارس که در مطالعات قبلی بهدست آمده بود تعیین شدند. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور شیکر g ۱۸۰ به مدت ۲۱ روز گرماگذاری شدند. پس از پایان ۲۱ روز، با استفاده از روش استاندارد شمارش پلیت (standard plate count)، شمارش جمعیت باکتریایی صورت گرفت. همچنین میزان تجزیه زیستی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید (۲۲). روش اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت بخش آلی استخراج شده به کار می‌رود. در این روش، نفت خام موجود در نمونه‌های مورد آزمایش (قبل و بعد از تجزیه زیستی) با استفاده از یک حلال غیرقطبی مانند تولوئن و دی‌کلرومتان استخراج می‌شود (۹). یک نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های مشخص نفت خام جهت تعیین مقادیر هیدروکربن در نمونه‌ها رسم می گردد. بر اساس این نمودار رابطه‌ای بین جذب نوری و غلظت هیدروکربن در حلال غیر قطبی وجود دارد:

غلظت هیدروکربن‌های نفت خام در حلال = جذب نوری

به منظور استخراج هیدروکربن‌ها، ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ها با حجم مساوی از تولوئن مخلوط گردید. چگالی نوری (OD) هیدروکربن‌های استخراج شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید. یک منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های نفت خام جهت تعیین مقادیر هیدروکربن در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه زیستی از تفاضل بین غلظت‌های اولیه و نهایی هیدروکربن‌ها محاسبه گردید (۲۰).

*و) آنالیز آماری :* به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نسخه بیستم نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. مرز معنی‌داری بر روی سطح $p<0/05$ قرار داده شد.

## یافته‌ها

*الف) تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه های رسوبات:* در این مطالعه میزان دما، pH و قابلیت هدایت الکتریکی (EC) نمونه های رسوبی تعیین و بر اساس آن میزان شوری نمونه ها مشخص گردید. به طور میانگین میزان دمای نمونه ها ۲۸ درجه سلسیوس، pH برابر ۸/۲، میزان قابلیت هدایت الکتریکی ۴۷/۵ (دسی زیمنس بر متر ds/m) و میزان شوری ۲۸/۷ گرم بر لیتر محاسبه شد.

*ب) جداسازی، خالص سازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام:* در این مطالعه با استفاده از روش‌های غنی‌سازی و جداسازی، ۳ باکتری تجزیه کننده نفت از رسوبات منطقه ساحلی جداسازی گردید. پس از آن غربالگری بر اساس روش متلاشی کردن قطره به منظور بررسی تولید بیوسورفکتانت صورت گرفت. باکتری‌های جداسازی شده قادر به تولید بیوسورفکتانت بودند. هر ۳ باکتری در مدت زمان‌های متفاوت (کمتر از ۱ دقیقه تا بیش از ۳ دقیقه) توانستند نفت خام را به صورت پایدار متلاشی نمایند. یکی از باکتری‌ها که به عنوان سویه برتر در نظر گرفته شد در مدت زمان کمتر از یک دقیقه قادر به متلاشی کردن نفت خام به صورت پایدار بود.

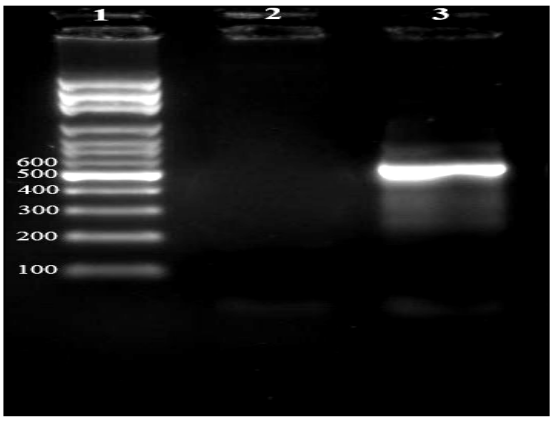
*ج) شناسایی مولکولی:* نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن *16S rRNA*، تکثیر قطعه ۵۰۷ جفت بازی را نشان داد (شکل ۲). نتایج به دست آمده از آنالیز و بلاست توالی *16S rRNA* باکتری منتخب نشان داد که این باکتری متعلق به جنس *آلکانی‌وراکس* است و دارای شباهت ۹۹ درصد به گونه دیزلولی می‌باشد. بنابراین با توجه به درخت فیلوژنی به دست آمده از مقایسه توالی نوکلئوتیدی این سویه با سویه های خویشاوند و عدم شباهت ۱۰۰ درصد، باکتری جداسازی شده به عنوان یک سویه جدید معرفی گردید (شکل ۳).

*د) بررسی تجزیه زیستی توسط سویه جداشده در غلظت‌های مختلف نفت خام:* در این مطالعه میزان رشد باکتری در غلظت های مختلف نفت خام در مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد باکتری با استفاده از روش شمارش کلنی ها بر روی پلیت (SPC) در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد نفت خام اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان رشد در غلظت ۱ درصد نفت خام، $۴ \times ۱۰^{۱۰}$ باکتری در میلی لیتر و میزان رشد در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد، به ترتیب $۳/۷ \times ۱۰^{۱۰}$ و $۵/۶ \times ۱۰^{۵}$ اندازه‌گیری گردید. نتایج به صورت منحنی لگاریتمی در نمودار ۱ نشان داده شده است.

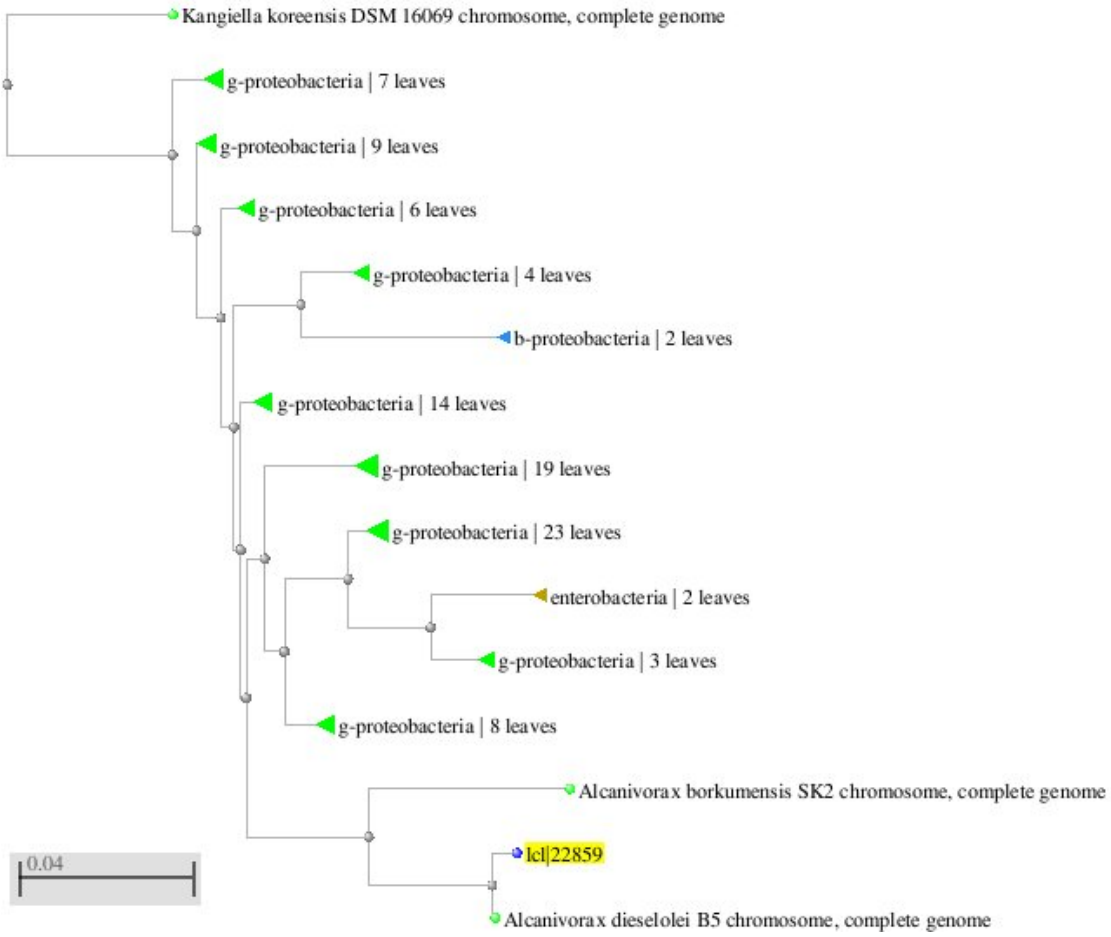
درصد تجزیه زیستی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر بررسی شد. بیشترین میزان تجزیه نفت خام توسط سویه جداشده در غلظت ۱ درصد نفت خام ۶۸/۳۷ درصد و در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد، به ترتیب ۶۷/۹۷ و ۱۳/۲ درصد محاسبه گردید. بر اساس نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مشخص گردید که اختلاف معنی داری بین غلظت‌های مختلف نفت خام و میزان تجزیه زیستی توسط باکتری *آلکانی‌وراکس دیزلولی* وجود دارد (جدول ۱).

## بحث

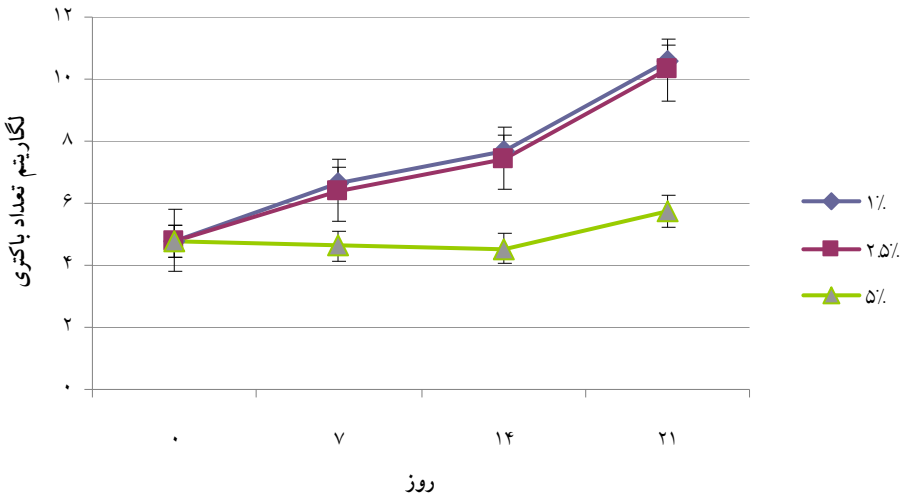
آلودگی محیط زیست با مواد شیمیایی سمی و مضر یکی از مشکلات اصلی جامعه صنعتی امروزی است. صنعت نفت به واسطه تولید مقادیر زیادی هیدروکربن و مشتقات آن مسئول آلودگی هوا، خاک، رودخانه‌ها و آب‌های زیرزمینی می باشد (۲۳). اصلاح زیستی تکنیکی را برای پاکسازی آلاینده‌ها با استفاده از افزایش فرآیندهای تجزیه زیستی که در طبیعت رخ




شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR، ۱) مارکر (۱۰۰bp)، ۲) کنترل منفی، ۳) قطعه ۵۰۷ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*




شکل ۳: درخت فیلوژنی سویه مورد بررسی در این تحقیق که با شماره شناسایی ۲۲۸۵۹ مشخص گردیده




نمودار ۱: منحنی لگاریتمی رشد *آلکانی‌ووراکس دیزلولی* در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد نفت خام
(error bar ها براساس میزان standard error داده ها تنظیم شده اند)

جدول ۱: نتایج آنالیز واریانس جهت بررسی تجزیه زیستی غلظت‌های مختلف نفت خام توسط *آلکانی‌وراکس دیزلولی*

| | مجموع مجذورات | درجه آزادی | میانگین مجذورات | F آزمون | سطح معنی‌داری |
|---|---|---|---|---|---|
| **بین گروه‌ها** | ۶۰۴۲/۹۰۹ | ۲ | ۳۰۲۱/۴۵۴ | ۷۵۱۱/۹ | |
| **درون گروه‌ها** | ۲/۴۱۳ | ۶ | ۰/۴۰۲ | ۰۳ | ۰/۰۰۵ |
| **کلی** | ۶۰۴۵/۳۲۲ | ۸ | | | |

می‌دهد، فراهم می سازد (۲۴). تجزیه زیستی، شکسته شدن مواد پیچیده به مواد ساده معدنی نظیر دی‌اکسید کربن، آب و بیوماس سلولی توسط میکروب‌ها می‌باشد. به‌طور برجسته، تجزیه زیستی نفت خام و ترکیبات نفتی در محیط‌های آبی و خاکی توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام می گردد (۲۵). تعداد میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن در مکان‌های آلوده به نفت خام به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (۲۶). خط ساحلی به طور خاص در برابر ریزش‌های نفتی آسیب می‌بینند. جوامع میکروبی دارای تنوع بالا با روش‌های متابولیکی متفاوت می‌باشند که در عمق چند میلی‌متری آب و خاک قرار گرفته اند و هر یک از آنها می‌توانند در ابتدا با پتانسیل بالا برای تجزیه زیستی نفت خام مورد توجه قرار گیرند (۲۷). به دلیل احتمال استفاده از توانمندی تجزیه زیستی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در اصلاح ریزش‌های نفتی، شناسایی این باکتری‌ها در محیط‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (۲۸).

در این مطالعه ۳ سویه باکتریایی تجزیه کننده نفت از رسوبات منطقه ساحلی عسلویه جداسازی گردید. حضور این سه باکتری در رسوبات آلوده منطقه ساحلی، نشان دهنده توانایی احتمالی سازش‌پذیری با محیط‌های آلوده به هیدروکربن می‌باشد. تجزیه کننده‌های هیدروکربن کمتر از یک درصد از جمعیت میکروبی موجود در اکوسیستم‌های فاقد آلودگی‌های نفتی را دارا می‌باشند. در حالی‌که این میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های آلوده به نفت خام، جمعیتی تا حدود ۱۰۰ درصد را تشکیل می‌دهند (۲۹). در مطالعه حاضر هر ۳ باکتری جداسازی شده از رسوبات منطقه ساحلی توانایی تولید بیوسورفکتانت را داشتند. باکتری‌های جداسازی شده قادر بودند در مدت زمان‌های متفاوت (کمتر از ۱ دقیقه تا بیش از ۳ دقیقه) نفت خام را به صورت پایدار متلاشی نمایند. بنابراین با استفاده از غربال‌گری به روش متلاشی کردن قطره جهت بررسی تولید بیوسورفکتانت، یک سویه به عنوان سویه برتر در تولید بیوسورفکتانت و تجزیه نفت انتخاب گردید. سویه برتر قادر بود در مدت زمان کمتر از یک دقیقه نفت خام را به صورت پایدار متلاشی نماید.

میکروب‌ها اغلب مواد بیوسورفکتانت یا مواد پلی‌مری خارج سلولی را به منظور افزایش دسترسی به کربن آلی آب‌گریز منتشر می‌سازند. این نخستین مرحله تجزیه توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد (۲۱). باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در مناطقی که آلوده به هیدروکربن هستند به میزان فراوان یافت می‌شوند (۳۰). بنابراین کشف میکروارگانیسم‌های تولید کننده بیوسورفکتانت برای اصلاح زیستی با اهمیت می‌باشد (۳۱). فایرورناز (Firorenaz) و همکاران در سال ۱۹۹۱ افزایش دو برابری تعداد باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت در خاک‌های آلوده به نفت را نشان دادند (۷). مطالعات مختلف نشان دهنده وجود ارتباط مستقیم بین تجزیه زیستی نفت خام و تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها می باشد (۷، ۸، ۳۵-۳۲).

در مطالعه حاضر، با استفاده از روش مولکولی مبتنی بر توالی یابی *16S rRNA*، باکتری *آلکانی‌وراکس دیزلولی* شناسایی گردید. برخی از باکتری‌های هیدروکربنوکلاستیک (Hydrocarbonoclastic) به صورت بسیار اختصاصی تجزیه کننده هیدروکربن هستند و اعتقاد بر این است که این باکتری ها

نقش کلیدی در حذف هیدروکربن‌ها از محیط زیست آلوده دارند (۲۶). باکتری‌های هیدروکربنوکلاستیک که اجزای هیدروکربنی نفت خام اعم از آلکان‌ها و هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک را تجزیه می نمایند در محیط‌های دریایی و به‌طور پی در پی در منطقه جزر و مدی آلوده به نفت خام تفوق یافته‌اند. تعداد محدودی از جنس‌های *آلکانی‌ووراکس* (*Alcanivorax*)، *مارینوباکتر* (*Marinobacter*)، *تالاسولیتوس* (*Thallassolituus*)، *سیکلوکلاستیکوس* (*Cycloclasticus*) و *اولیسپیرا* (*Oleispira*) شایع‌ترین باکتری‌های هیدروکربنوکلاستیک محسوب می‌شوند. جنس *آلکانی‌ووراکس* به عنوان یک تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفت خام در محیط زیست‌های دریایی آلوده به نفت غالب بوده و به طور معمول در فرآیند اصلاح زیستی آلودگی هیدروکربنی مشارکت می نماید. تا کنون ۵ گونه از *آلکانی‌ووراکس* شامل *بورکومنسیس* (*borkumensis*)، *ونوستنسیس* (*venustensis*)، *جادنسیس* (*jadensis*)، *دیزلولی* (*dieselolei*) و *بالریکوس* (*balearicus*) جداسازی شده و تجزیه زیستی آلکان‌ها توسط آنها به اثبات رسیده است (۳۶). *آلکانی‌ووراکس* در آب های غیر آلوده به تعداد اندک یافت می گردد. اما در آب ها و خطوط ساحلی آلوده به نفت خام به میزان بسیار زیادی دیده می‌شود. به طوری‌که ممکن است ۸۰ تا ۹۰ درصد از جامعه میکروبی تجزیه کننده نفت را تشکیل دهد (۳۷). مطالعات متعدد نشان می دهند که جنس *آلکانی‌ووراکس* قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفت خام در آب و رسوبات دریایی آلوده به نفت می‌باشد (۴۲ –۳۸).

این باکتری قادر بود با تولید بیوسورفکتانت نفت خام را به‌طور مؤثری تجزیه نماید. رشد باکتری در حضور غلظت‌های مختلف نفت خام متفاوت بود. منحنی رشد باکتری‌ها (نمودار ۱) نشان داد که مناسب‌ترین غلظت برای رشد باکتری، غلظت ۱ درصدی نفت خام می باشد. میزان رشد باکتری در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد نفت خام با کاهش همراه بود. تعداد باکتری‌ها در ابتدای آزمایش $۶ \times ۱۰^{۴}$ CFU/ml تنظیم گردید. پس از ۲۱ روز گرماگذاری این تعداد به $۴ \times ۱۰^{۱۰}$CFU/ml در ۱٪ نفت خام، $۳/۷ \times ۱۰^{۱۰}$ CFU/ml در ۲/۵٪ و $۵/۶ \times ۱۰^{۵}$ CFU/ml در ۵٪ افزایش یافت. تخلیه هیدروکربن‌ها به محیط‌های آبی و خاکی که حاوی مقادیر ناچیزی از ازت و فسفات معدنی هستند، اغلب نسبت کربن به ازت و کربن به فسفر را بسیار افزایش می دهد. این امر برای رشد میکروارگانیسم‌ها مناسب نمی‌باشد. به نظر می‌رسد که در دسترس بودن مواد مغذی به ویژه ازت و فسفات، مهم‌ترین عامل محدود کننده در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های طبیعی می باشند. بر اساس گزارش گیبس، حداقل مقدار ازت و فسفات مورد نیاز برای تجزیه زیستی هر گرم نفت خام در دریا معادل ۰/۱۹۵ گرم $NH_4CL$ و ۰/۰۲۴ گرم $NaHPO_4$ است (۴۳). برقراری تعادل بین نسبت کربن به ازت و کربن به فسفر برای رشد باکتری ضروری می باشد. با توجه به اینکه ازت و فسفر به عنوان عوامل محدود کننده رشد برای باکتری‌ها محسوب می‌شوند با برهم خوردن تعادل بین نسبت‌های کربن به ازت و فسفر در غلظت‌های بالای نفت خام، رشد باکتری کاهش یافته و بنابراین مناسب‌ترین غلظت برای رشد باکتری غلظت ۱ درصدی نفت خام بود.

میزان تجزیه زیستی نفت خام توسط این باکتری در غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ درصد به ترتیب ۶۸/۳۷، ۶۷/۹۷ و ۱۳/۲ درصد محاسبه گردید. تجزیه زیستی رابطه معکوس با غلظت نفت خام دارد (۹ و ۲۲). ترکیباتی مانند ترکیبات آروماتیک اشباع شده (Saturates)، آروماتیک‌ها و ترکیبات قطبی موجود در نمونه‌های مختلف نفت خام به میزان متفاوتی توسط ارگانیسم‌های مشابه تجزیه‌پذیر هستند. تجزیه‌پذیری به تنهایی بر اساس ساختار شیمیایی تعیین نمی‌گردد بلکه عوامل دیگری نیز دخیل می باشند. در دسترس بودن این ترکیبات در نمونه‌های مختلف نفت خام، متفاوت می‌باشد. تجزیه ترکیبات اشباع شده دارای وزن مولکولی بزرگتر از ۵۰۰ گرم بر مول توسط ارگانیسم‌ها امکان‌پذیر نیست. زیرا این اندازه با کانال‌های ورودی و خروجی غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی برابری می‌کند (۹). میزان تجزیه زیستی تحت تأثیر غلظت‌های اجزای نفت می‌باشد. میکروب‌ها ممکن است غلظت‌های کم آلاینده‌ها

را به‌طور غیر مؤثری تجزیه نمایند. اگر چه غلظت‌های بالای هیدروکربن‌ها نیز ممکن است به وسیله محدودیت مواد مغذی و اکسیژن یا از طریق اثرات سمی اعمال شده توسط هیدروکربن‌های فرار از تجزیه زیستی ممانعت به عمل آورد. بنابراین به نظر می‌رسد برای بسیاری از هیدروکربن‌ها یک محدوده غلظت مناسب وجود دارد که تجزیه زیستی تحت آن غلظت می‌تواند انجام پذیرد (۴۴). در این مطالعه با افزایش غلظت نفت خام از ۱ به ۵ درصد میزان تجزیه زیستی از ۶۸/۳۷ به ۱۳/۲ درصد کاهش یافت.

مطالعه‌ای توسط وی یاس (Vyas) و داو (Dave) در سال ۲۰۰۷ به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفت خام بر میزان تجزیه زیستی باکتریهای هتروتروف جداسازی شده از آب سواحل ایالت گجرات هندوستان انجام شد. در این تحقیق از غلظت های مختلف نفت خام (۲ تا ۶ گرم بر لیتر) استفاده شد و مشخص شد که بیشترین میزان رشد و تجزیه زیستی نفت خام توسط سویه های جداسازی شده در غلظت ۵ گرم بر لیتر نفت خام صورت می گیرد (۴۵).

ایتومی (Etoumi) در سال ۲۰۰۷ نشان داد که مناسب‌ترین غلظت برای سویه *PRCW B1*، غلظت ۱ درصدی نفت خام با حداکثر رشد به میزان ۰/۴۲۹ است. درحالی‌که این میزان برای سویه PRCW E1، ۰/۱۱۱ در غلظت ۵ درصد نفت خام گزارش گردید (۳۲). ساتیش کومار (Sathishkumarm) و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که با افزایش غلظت نفت خام از ۱ درصد به ۱۲ درصد میزان تجزیه زیستی توسط ائتلاف باکتریایی از ۷۷ درصد به ۴۵ درصد کاهش یافت (۲۲).

نتایج مطالعه حسن شاهیان و امتیازی در سال ۲۰۰۸ نشان داد که بیشترین تعداد باکتری‌های *رودوکوکوس* سویه PG-5 و *باسیلوس* سویه H بر روی پلیت‌های حاوی ۲/۵ درصد نفت خام بوده است. در حالی‌که بیشترین تعداد باکتری *سودوموناس* سویه‌های BC و CS-2 بر روی پلیت‌های حاوی ۵ درصد نفت خام گزارش گردید (۱۴). زاهد (Zahed) و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش نمودند که با افزایش غلظت نفت خام از ۱۰۰ به ۲۰۰۰ میلی‌گرم/ لیتر، میزان تجزیه زیستی از ۶۷/۳ به ۴۴/۷ درصد با پراکنده‌ساز و از ۶۴/۲ به ۳۷/۶ درصد بدون پراکنده‌ساز کاهش یافت (۴۶). نتیجه مطالعه درویشی (Darvishi) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که در غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۱۰ درصد نفت خام سروش، بیشترین میزان تجزیه زیستی توسط باکتری *انتروباکترکلوآکه* در حضور ۰/۲۵ درصد نفت خام انجام می شود (۲۰). زاهد (Zahed) و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که در غلظت‌های مختلف نفت خام، میزان تجزیه زیستی متفاوت است. به طوری که میزان تجزیه در غلظت‌های کم نفت خام به‌طور معناداری افزایش می یابد. میزان تجزیه توسط ائتلاف باکتریایی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر و کمتر از آن، بیشتر از ۲۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر گزارش شد (۴).

## نتیجه‌گیری

ضرورت تکنولوژی‌های درمانی مناسب و مؤثر برای ریزش‌های نفت خام در محیط‌های دریایی اثبات شده است. امروزه اصلاح زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن به عنوان یک تکنولوژی مؤثر و کارآمد در روند پاکسازی هیدروکربن‌های نفت خام مورد توجه قرار گرفته است. از آنجایی که جنس *آلکانی وراکس* به عنوان یک باکتری هیدروکربونوکلاستیک بومی محیط زیست‌های دریایی آلوده به هیدروکربن می‌باشد و توانایی این باکتری در تجزیه اجزای نفت خام اعم از آلکان‌ها و هیدروکربن‌های پلی آروماتیک (PAHs) به اثبات رسیده است، لذا این باکتری می تواند در فرآیند اصلاح زیستی در پاکسازی محیط‌های دریایی به عنوان یک باکتری مؤثر و کارآمد مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از بخش پژوهش سازمان منطقه ویژه اقتصادی انرژی پارس (عسلویه) به دلیل حمایت مالی و همچنین از مدیریت و کارکنان محترم پژوهش، کارشناسان محترم آزمایشگاه HSE به دلیل همکاری صمیمانه در اجرا این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References


**1.** Delille D, Delille B. Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments. Mar Environ Res. 2000; 49: 403-417.

**2.** Delille D, Delille B, Pelletier E. Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated subanarctic intertidal sediment: the microbial response. Microb Ecol. 2002; 44: 118-126.

**3.** Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresour Technol. 2011; 1: 25-27.

**4.** Zahed MA, Abdul Aziz H, Hasnain Isa M, Mohajeri L, Mohajeri S, KuttySh RM. Kinetic modeling band half life study on bioremediation of crude oil dispersed by Corexit 9500. J Hazardous Materials. 2011; 185: 1013-1027.

**5.** Obbard JP, Xu R. Bioremediation of petroleum contaminated beach sediments: use of crude Palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. Water Air Soil poll. 2004; 157: 149-161.

**6.** AL-Darbi MM, Saeed NO, Islam MR. Biodegradation of natural oils in seawater. Energ Source. 2005; 27: 19-34.

**7.** GhayyomiJazeh M, Forghani F, Deog-Hwan O. Biosurfactant production by *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soils of Sirri Island. American J Appl Sci. 2012; 9: 1-6.

**8.** Thavasi R, Sharma Sh, Jayalakshmi S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. J Pet Environ Biotechnol. 2011; 1: 1-6.

**9.** Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour Technol. 2002; 85: 257 -261.

**10.** Akhavan Sepahi A, Dejban Golpasha I, Emami M, Nakhoda AM. Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus* spp. Iran J Environ Health Sci Eng. 2010; 5 (3): 149-154.

**11.** Liu YC, Li LZ, Wu Y, Tian W, Zhang LP, Xu L, Shen QR, Shen B. Isolation of an alkane-degrading Alcanivorax sp. Strain 2B5 and cloning of the alkB gene. Bioresour Technol. 2010; 101: 310-316.

**12.** Yoshikawa T, Murata K, Uno S, Koyama J, Maeda H, Hayashi M, Sadaba RB. Biodegradation of heavy C oil by *Alcanivorax sp.* a1 strain isolated from recovered Bunker oil spilt in the "Solar I" accident. Mem Fac Fish Kagoshima Univ. 2010; 67-73.

**13.** Hasanshahian M, Emtiazi G. Isolation and molecular detection of *Alcanivorax dieselolei* in the Persian Gulf and the the study of biodegradation ability for remediation of oil pollution. BJM. 2012; 1(1): 31-40.

**14.** Hasanshahian M, Emtiazi G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. Int Biodeterior Biodegrad. 2008; 62: 170-178.

**15.** Corwin DL, Lesch SM. Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture. Compag. 2005; 46: 11-43.

**16.** Adebusoye SA, Amund OO, Ilori MO, Domeih DO, Okpuzo J. Growth and biosurfactant synthesis by Nigerian hydrocarbon-degrading estuarine bacteria. Int J Trop Biol. 2008; 56: 1603-1611.

**17.** Sneha KS, Padmapriya B, Rajeswari T. Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. Int J Pharm Biol Arc. 2012; 3(2): 321-325.

**18.** Thavasi R, Sharma Sh, Jayalakshmi S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. J Pet Environ Biotechnol. 2011; S1:001: 1-6.

**19.** Queipo-Ortuno MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Jose Bravo M, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15: 293-296.

**20.** Darvishi P, Mowla D, Ayatollahi S, Niazi A. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. Desalination Water Treatment. 2011; 28: 46-54.

**21.** Kim YM, KyuAhnaCh, Han Wood S, Yeol Jung G, Moon Park J. Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. J Biotechnol. 2009; 144: 293-298.

**22.** Sathishkumarm M, Binupriya AR, Baik SH, Yun SE. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. Clean. 2008; 36: 92-96.

**23.** Adebusoye SA, Ilori MO, Obayori OS, .Oyetibo GO, Akindele KA, Amund OO. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. Environmentalist. 2010; 30: 24-34.

**24.** Elredaisy SMA. Ecological benefits of bioremediation of oil contaminated water in Rich Savannah of Palogue, upper Nile Area-Southern Sudan. J Bioremed Biodegrad. 2010; 1: 103.

**25.** Saleh AB, Ghazali FM, Abdrahman RNZ, Basri M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. Indian J Biotechnol. 2003; 2: 411-425.

**26.** Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria. Environ Microbiol. 2009; 11(10): 2477-2490.

**27.** Lliros M, Gaju N, Garcia de Oteyza T, Grimalt JO, Esteve I, Martinez-Alonso M. Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. Sci Total Environ. 2008; 393: 39-49.

**28.** Abed RMM, Koster J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. Int Biodeterior Biodegrad. 2005; 55: 29-37.

**29.** Rahman PKSM, Thahira-Rahman L, Lakshmanaperumalsamy P, Banat I M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. J Basic Microbiol. 2002; 42: 284-291.

**30.** Sifour M, Al-Jilawi MH, Aziz Gh M. Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. Pak J Biol Sci. 2007; 10: 1331-1335.

**31.** Satpute SK, Bhawsar BD, Dhakephalkar PK, Chopade BA. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. Indian J Mar Sci. 2008; 37: 243-250.

**32.** Etoumi A. Microbial treatment of waxy crude oils for mitigation of wax precipitation. J Pet Sci Eng. 2007; 55: 111-121.

**33.** Pirollo MPS, Mariano1 AP, Lovaglio1 RB, Costa SGVAO, Walter V, Hausmann R, Contiero J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon contaminated site. J Appl Microbiol. 2008; 105: 1484-1490.

**34.** Millioli VS, Servulo ELC, Sobral L GS, DeCarvalho DD. Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. Global NEST J. 2009; 11: 181-188.

**35.** Sneha KS, Padmapriya B, Rajeswari T. Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* from oil spilled soils. Int J Pharm Biol Arc. 2012; 3: 321-325.

**36.** Yoshikawa T, Murata K, Uno S, Koyama J, Maeda H, Hayashi M, Sadaba RB. Biodegradation of heavy C oil by *Alcanivorax* sp. a1 strain isolated from recovered Bunker oil spilt in the "Solar I" accident. Mem Fac Fish Kagoshima Univ. 2010; Special Issue: 67-73.

**37.** Mancini G, Cappello S, Yakimov MM, Polizzi A, Torregrossac M. Biological approaches to the treatment of saline oily waste (waters) originated from marine transportation. Chem Eng Trans. 2012; 27: 37-42.

**38.** Alonso-Gutiérrez J, Costa MM, Figueras A, Joan Albaigés J, Viñas M, Solanas AM, Novoa B. Alcanivorax strain detected among the cultured bacterial community from sediments affected by the 'Prestige' oil spill. Mar Ecol Prog Ser. 2008; 362: 25-36.

**39.** Zrafi-Nouira I,Guermazi S, Chouari R, Safi NMD, Pelletier E, Bakhrouf A, Saidane-Mosbahi D, Sghir A. Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zarzatine oil. Biodegradation. 2009; 20: 467-486.

**40.** Radwan S, Mahmoud H, Khanafer M, Al-Habib A, Al-Hasan R. Identities of epilithic hydrocarbon-utilizing diazotrophic bacteria from the Arabian Gulf coasts, and their potential for oil bioremediation without nitrogen supplementation. Microb Ecol. 2010; 60: 354-363.

**41.** Wang W, Wang L, Shao Z. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the sub tropical seawater of Xiamen Island. Microb Ecol. 2010; 60: 429-439.

**42.** Al-Awadhi H, Al-Mailem D, Dashti N, Khanafer M, Radwan S. Indigenous hydrocarbon-utilizing bacterioflora in oil-polluted habitats in Kuwait, two decades after the greatest man-made oil spill. Arch Microbiol. 2012; 194: 689-705.

**43.** Abdolhasani A, Ebrahimipour G. Effect of mineral nitrogen and phosphate concentration on oil degradation by two bacterial isolates from Persian Gulf sediments. Environ Sci. 2008; 5(4): 145-150.

**44.** Venosa AD, Zhu X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill Sci Technol Bull. 2003; 8: 163-178.

**45.** Vyas TK, Dave BP. Effect of crude oil concentrations, temperature and pH on growth and degradation of crude oil by marine bacteria. Indian J Mar Sci. 2007; 36: 76-85.

**46.** Zahed MA, Abdul Aziz H, Hasnain Isa M, Mohajeri L. Effect of initial oil concentration and dispersant on crude oil biodegradation in contaminated seawater. Bull Environ Contam Toxicol. 2010; 84: 438-442.

**47.** Zhang Y, Zhao Z, Chen CTA, Tang K, Su J, Jiao N. Sulfur metabolizing microbes dominate microbial communities in Andesite-Hosted Shallow-Sea hydrothermal systems. PLoS ONE. 2012; 7: 1-11.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

# Evaluation of crude oil biodegradation by *Alcanivorax dieselolei*, an isolated strain from the coastal sediments of Persian Gulf

**Narges Boroomandi[1], Mohammad Mehdi Mahmoodi[2], Dariush Mowla[3], Abbas Ali Rezaeian[4], Masood Boostani[5]**

[1] MS.c., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology,Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
[3] Professor, Department of Chemical Engineering, Engineering School, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[4] Instructor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[5] MS.c., Department of Health, Safety and Environment, Pars Special Economic Energy Zone, Asalouyeh, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: Oil pollutions are one of the major problems threatening environment. Biodegradation using hydrocarbon-degrading indigenous bacteria is considered as a convenient method both economically and environmentally. The genus *Alcanivorax* is known as a petroleum hydrocarbon degrader in petroleum-contaminated marine environments. The purpose of this study was to evaluate the capacity of *Alcanivorax dieselolei*, isolated from the coastal sediments of Persian Gulf for crude oil biodegradation.

*Material & Methods:* In this applied-fundamental study, first oil degrading bacteria were isolated from the coastal sediments of Persian Gulf and were enriched in media. The isolated bacterium was identified using molecular identification based on *16S rRNA* sequence. The oil degrading ability of the isolates was assessed using various concentrations of crude oil.

*Results:* Based on molecular approaches the isolated bacterium was identified as *Alcanivorax dieselolei*. This bacterium was able to disintegrate oil droplets stably in less than one minute. Results showed that the biodegradation rates at 1, 2.5 and 5% concentrations of crude oil were 68.37, 67.97 and 13.2% respectively.

*Conclusion:* Since *Alcanivorax* genus is an indigenous bacterium in hydrocarbon polluted marine environments and its capability in biodegradation of crude oil has been proved, using this bacterium to remove oil pollutants is certainly possible.

*Keywords:* Crude oil, Biodegradation, *Alcanivorax dieselolei*, Persian Gulf.

**Correspondence to**: Mohammad Mehdi Mahmoodi

Tel: +989177044800

E-mail: mmmahmoodi636@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 148-161.