مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره چهارم (پیاپی ۱۷) زمستان ۱۳۹۲
صفحات ۳۲۷-۳۲۰

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری تجزیه کننده هگزادکان از کمپوست

محمد رضا سمائی*[۱]، سید باقر مرتضوی[۲]، بی‌تا بخشی[۳]، احمد جنیدی جعفری[۴]، مینا بوستان‌شناس[۵]

[۱] استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، [۲] دانشیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، [۳] دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، [۴] دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، [۵] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه نشت مواد نفتی از خطوط انتقال، پالایشگاه و جایگاه های سوخت و ورود آنها به خاک و آب های زیرزمینی به یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی ایران تبدیل شده است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی یک باکتری تجزیه‌کننده هگزادکان از کمپوست انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش هگزادکان به عنوان آلاینده مدل هیدروکربن‌های گازوییل انتخاب گردید. به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هگزادکان، از کمپوست رسیده استفاده شد. در ادامه یک باکتری انتخاب و به کمک روش PCR شناسایی گردید. در نهایت کارایی باکتری جداسازی شده جهت حذف هگزادکان به عنوان تنها منبع کربن و نیز میزان رشد باکتری در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس روش های مورفولوژی، بیوشیمیایی و تعیین توالی این باکتری به عنوان *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* شناسایی شد. این باکتری پس از ۳۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قادر به حذف ۴۹/۶۹ درصد از هگزادکان بود. به طوری که میزان هگزادکان از ۳۰۰۰ به ۱۵۱۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. همچنین باکتری مورد نظر در برابر شوری دارای مقاومت متوسط بود به طوری که توانست در غلظت ۲/۵ درصد نمک نیز رشد نماید.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان می‌دهد که در شرایط آب و هوایی گرم و خاک نسبتاً شور ایران، می‌توان از باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* به منظور حذف ترکیبات نفتی به‌ویژه گازوییل استفاده نمود. از این رو انجام مطالعات تکمیلی در سطح گسترده تر پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: هگزادکان، تجزیه زیستی، شناسایی مولکولی، *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه*.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۲

مقدمه

از آنجایی که نفت یکی از منابع مهم انرژی بوده، رهاسازی هیدروکربن‌های نفتی در محیط زیست در حال افزایش می باشد (۱). کشور ایران یکی از بزرگ ترین تولیدکنندگان نفت و فرآورده‌های نفتی جهان است (۲). امروزه آلودگی خاک و آب (به ویژه در محیط های دریایی و ساحلی) به آلاینده های هیدروکربنی به یکی از عمده ترین مشکلات زیست محیطی تبدیل شده است (۳ و ۴). گاهی غلظت این آلاینده‌ها در خاک کم است، اما مشاهده شده که غلظت هیدروکربن‌های کل در برخی خاک‌ها به ۴۵۰ گرم بر کیلوگرم خاک نیز می‌رسد. ۴۵ تا ۷۰ درصد آن را هیدروکربن‌های آلیفاتیک (آلکان‌ها، آلکن‌ها و آلکین‌ها) تشکیل می‌دهند (۵ و ۶). اغلب هیدروکربن‌های نفتی در آب بسیار نامحلول هستند (۷). آلودگی ناشی از گازوییل به

* آدرس برای مکاتبه: شیراز، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه مهندسی بهداشت محیط. تلفن: ۰۹۱۷۷۳۲۰۷۳۷ پست الکترونیک: mrsamaei@sums.ac.ir

طور مکرر گزارش شده است (۸). گازوییل عمدتاً از آلکان‌ها تشکیل شده است، اما مقدار کمی نیز ترکیبات آروماتیک (حدود ۴ درصد) دارد (۱).

نفت خام و فرآورده‌های نفتی حاوی انواع مختلفی از ترکیبات، عمدتاً هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک می‌باشند (۸). در بین آلکان ها، ان-آلکان های با زنجیره متوسط در زمره مهم ترین آلاینده‌های خاک قرار دارند (۴ و ۸). در این دسته، نرمال هگزادکان ($C_{16}H_{34}$) توسط بسیاری از پژوهشگران به عنوان آلاینده مدل به جای گازوییل به کار رفته است (۶ و ۹). از دلایل محققان برای انتخاب هگزادکان به عنوان آلاینده مدل می توان به حلالیت پایین در آب و نیز تجزیه پذیری سریع توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها اشاره نمود (۶).

روش های فیزیکی، حرارتی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی برای حذف این ترکیبات از آب و خاک پیشنهاد شده است. از میان تمام این روش ها فرآیندهای بیولوژیکی مورد توجه خاص قرار گرفته است. زیرا این فرآیندها دوست دار محیط زیست بوده و هزینه ی کمتری دارند. از آنجایی که تجزیه زیستی فرآیندی طبیعی است، عموماً از آن به عنوان یک فرآیند قابل قبول تصفیه زائدات برای مواد آلوده ای مانند خاک یاد می شود. باقیمانده تصفیه با این روش معمولاً فرآورده های بی ضرری است که برای نمونه می توان به آب، دی اکسید کربن و توده زیستی سلولی اشاره نمود.

فناوری‌های زیست‌پالایی در واقع سرعت طبیعی تجزیه زیستی را تشدید می نمایند (۱۰). راندمان زیست پالایی به میکروارگانیسم‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی و یا عوامل تقویت زیستی وابسته است (۱۱). در حال حاضر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، آرکی ها و قارچ‌ها، شناسایی شده‌اند که می‌توانند ترکیبات نفتی را تجزیه نمایند (۷). در حقیقت بیشتر ترکیبات نفتی به طور بیولوژیکی قابل تجزیه هستند. با این وجود در برخی از پژوهش ها از باکتری‌های خالص و در برخی دیگر از کنسرسیوم میکروبی به منظور حذف ترکیبات نفتی استفاده شده است (۲، ۴، ۱۲ و ۱۳). به عنوان نمونه حسن شاهیان (Hassanshahian) و همکاران ۲۵ گونه باکتریایی تجزیه کننده نفت خام را از محل های آلوده به نفت در خلیج فارس و دریای خزر جداسازی نمودند (۱۴). همچنین ژوزف (Joseph) و همکاران در هندوستان به جداسازی تقویت شده میکروب های تجزیه‌کننده نفت از لجن یک پالایشگاه نفت پرداختند (۱۵).

در این مطالعه دو سویه *باسیلوس* (*Bacillus*) از خاک آلوده به نفت خام جداسازی شد. در مطالعه دیگری که هووا (Hua) و همکاران با استفاده از روش ارزیابی ژن *16S rRNA*، باکتری تجزیه کننده نرمال هگزادکان را از خاک شناسایی و به عنوان *انتروباکتر کلوآکه* (*Enterobacter cloacae*) معرفی نمودند (۱۶). از گونه های مختلف *اسفینگوموناس* (*Sphingomonas*) نیز به منظور حذف آلاینده‌های مختلف از محیط زیست استفاده شده است. لیس (Leys) و همکاران تنوع گونه های *اسفینگوموناس* موجود در یک خاک آلوده به ترکیبات PAH را با استفاده از آنالیزهای PCR و DGGE مورد بررسی قرار دادند. آن ها گونه های مختلفی از *اسفینگوموناس* شامل *یانویی کویائه* (*yanoikuyae*)، *ادهاسیوا* (*adhaesiva*)، *اگرستیس* (*agrestis*)، *آروماتیکاوورانس* (*aromaticivorans*)، *مالی* (*mali*) و *پائوسیمو بیلیس* (*paucimobilis*) را جداسازی و شناسایی نمودند (۱۷). اما تاکنون مطالعه‌ای در مورد استفاده از گونه‌های *اسفینگوموناس* برای حذف هگزادکان منتشر نشده است. از آنجایی که گازوییل از طیف وسیعی از ترکیبات تشکیل شده و بسته به شرایط تولید و پالایشگاه سازنده آن دارای ترکیبات مختلفی است و همچنین به دلایل یاد شده، در این پژوهش هگزادکان به عنوان جایگزین و مدل گازوییل انتخاب شد. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه‌کننده گازوییل از کمپوست بود.

مواد و روش ها

الف) جداسازی باکتری از محیط کمپوست: در این پژوهش به منظور جداسازی باکتری‌های مناسب تجزیه کننده گازوییل، از کمپوست رسیده تولیدی توسط کارخانه کمپوست اصفهان استفاده گردید. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش

از شرکت مرک آلمان خریداری شد. ترکیب محیط کشت معدنی مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۸).

جدول۱: مواد مورد استفاده برای تهیه محیط کشت معدنی (۱۸)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم بر لیتر)
NH_4Cl	۴
KH_2PO_4	۲/۵
NaCl	۰/۵
$MgSO_4$	۰/۳
$FeCl_3.6H_2O$	۰/۳
$CaCl_2$	۰/۰۱
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۰۱

pH محیط کشت معدنی بر روی ۷ تنظیم شد. به منظور تهیه محیط معدنی جامد، ۱۵ گرم بر لیتر آگار به محیط کشت مایع اضافه گردید. پس از اتوکلاو کردن و سفت شدن محیط کشت درون پلیت‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر هگزادکان بر روی محیط کشت ریخته شد با پیپت پاستور به طور کامل پخش شد.

برای جداسازی باکتری، ابتدا در یک لوله آزمایش ۱ گرم کمپوست به ۹ میلی لیتر محیط کشت معدنی حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر هگزادکان اضافه شد. سپس مخلوط به دست آمده طی چند مرحله به شدت، با دستگاه شیکر، تکان داده شد. در پایان ۲ دقیقه اجازه داده شد تا عمل ته‌نشینی انجام شود. پس از آن با کمک لوپ استریل، از سوسپانسیون بالایی به منظور کشت خطی در محیط کشت معدنی آغشته به هگزادکان استفاده گردید. چند پلیت به همین روش تهیه و به مدت یک هفته در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس از تک کلنی های رشد یافته به منظور کشت بر روی پلیت های جدید استفاده گردید. این عمل به مدت ۳ ماه انجام شد تا از خالص‌سازی اطمینان حاصل شود. کشت‌ها هفته‌ای یک بار به محیط کشت تازه انتقال داده می‌شدند (۱۰).

ب) شناسایی باکتری جداسازی شده: پس از رشد کلنی های مختلف، یکی از باکتری‌های رشد یافته در کمتر از ۲۴ ساعت به منظور شناسایی انتخاب گردید. شناسایی با استفاده از روش توالی یابی ناحیه 16S rDNA انجام شد. در ابتدا به منظور استخراج DNA از کیت شرکت کیاژن استفاده شد.

برای تکثیر ژن *16S rDNA* از پرایمرهای عمومی پیشرو 16F27: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و پیرو 16R1488 : 5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC-3' استفاده گردید (۱۹ و ۲۰).

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد) انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر MJ Mini با شرایط دمایی ۲ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۵). محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

در نهایت محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فراوران فرستاده شدند. در ادامه با استفاده از نرم افزار BLAST نزدیک‌ترین سکانس‌های مشابه به باکتری مشخص و جنس و گونه آن شناسایی گردید.

ج) بررسی توان باکتری جداسازی شده در حذف هگزادکان: برای این منظور ۲۸ میلی‌لیتر محیط کشت معدنی و ۱ میلی‌لیتر ریزمغذی (۲/۵٪) در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. پس از استریل کردن آن مقدار ۹۰ میلی گرم هگزادکان (غلظت نهایی ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به آن اضافه گردید. در ادامه ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت براث، که باکتری به مدت ۲۴ ساعت در آن کشت داده شده بود، با چگالی نوری ۱

(در ۶۰۰ نانومتر) به آن اضافه شد. نمونه های شاهد فاقد باکتری بوده و دارای ۱ درصد سدیم آزاید بودند. نمونه‌ها به مدت ۳۳ روز در شیکرانکوباتور (دمای ۳۰ درجه و ۱۲۰ دور بر دقیقه) قرار داده شد. مقدار هگزادکان موجود طی روزهای مختلف مورد سنجش قرار گرفت. درصد حذف هگزادکان توسط باکتری جداسازی شده تعیین شد. همچنین طی این مدت میزان رشد باکتری با اندازه‌گیری چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید.

جهت سنجش میزان هگزادکان از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-FID) استفاده شد. دماهای دتکتور و انژکتور به ترتیب بر روی ۲۷۰ و ۲۵۰ درجه‌ی سلسیوس تنظیم شد. دمای ستون به مدت ۱ دقیقه بر روی ۱۲۵ درجه نگه داشته شد، سپس به میزان ۱۵ درجه بر دقیقه افزایش داده شد تا به ۱۸۰ درجه سانتی گراد برسد. میزان توقف دما در ۱۸۰ درجه نیز ۳ دقیقه تنظیم گردید (۵).

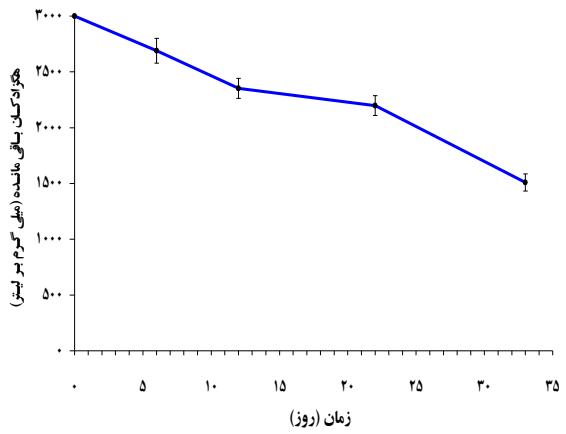
د) بررسی میزان تحمل شوری توسط باکتری جداسازی شده:

به منظور بررسی تحمل شوری، رشد باکتری جداسازی شده در غلظت‌های ۰، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از محیط کشت نوترینت براث استفاده شد و مقادیر مختلفی نمک بر حسب درصد وزن به حجم به آن اضافه گردید. سپس یک کلنی از باکتری (۵۰ میکرولیتر) را در آن کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر پس از این مدت اندازه‌گیری و به عنوان معیاری از رشد باکتری درنظر گرفته شد (۱۰).

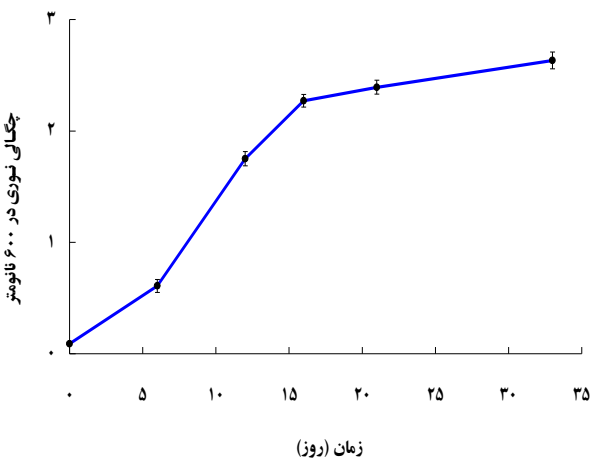
یافته‌ها

پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم، باکتری مورد نظر به عنوان گرم منفی تشخیص داده شد. همچنین کلنی های این باکتری بر روی محیط کشت معدنی حاوی هگزادکان به رنگ نارنجی دیده شد. پس از تعیین توالی محصولات PCR، قطعه ۱۳۸۱ جفت بازی به دست آمد. این توالی پس از بازسازی و اصلاح، وارد نرم‌افزار Chromas شد. سپس پاسخ پرایمرهای پیشرو و پیرو بررسی و توالی ژنی کامل گونه به صورت دو رشته DNA بازسازی گردید. پس از بلاست این گونه در پایگاه اینترنتی NCBI، و مقایسه با گونه های ثبت شده در این پایگاه، گونه مورد نظر با شباهت ۹۹ درصد به گونه *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* (*Sphingomonas yanoikuyae*) تعلق داشت.

در نمودار ۱ میزان حذف هگزادکان توسط باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* در مدت ۳۳ روز نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود میزان هگزادکان پس از ۲۲ روز از ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۲۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و پس از ۳۳ روز به ۱۵۱۰ میلی‌گرم بر لیتر رسیده است. به عبارت دیگر ۲۶/۷ و ۴۹/۷ درصد هگزادکان به ترتیب طی ۲۲ و ۳۳ روز توسط باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* مصرف شده است. در نمودار ۲ رشد این باکتری، که با اندازه‌گیری چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر تعیین شده، طی این مدت نشان داده شده است. در نمودار ۳ رشد باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* در غلظت های مختلف نمک نشان داده شده است. رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و با محاسبه چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، رشد باکتری کند می شود. همچنین چگالی نوری از ۰/۵۶ در غلظت نمک ۰ درصد به ۰/۲۱ در غلظت نمک ۲/۵ درصد می‌رسد. در غلظت ۵ درصد باکتری قادر به رشد نبوده است.



نمودار ۱: میزان حذف هگزادکان توسط باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه*

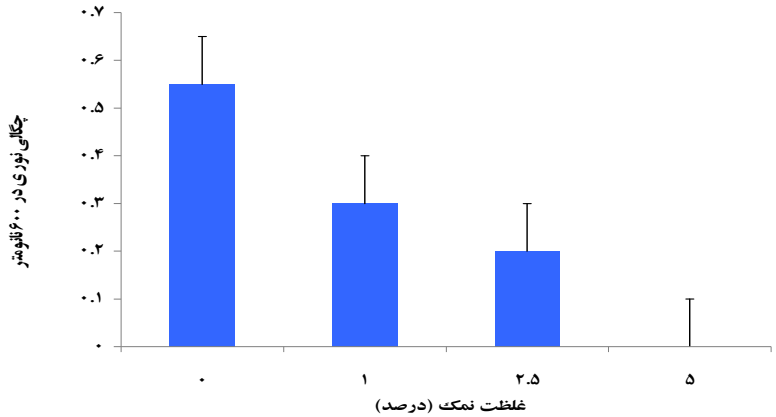


نمودار ۲: رشد باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* در محیط مایع

بحث

در این مطالعه از محیط کمپوست به منظور جداسازی باکتری تجزیه‌کننده هگزادکان مورد استفاده قرار گرفت. باکتری مورد نظر پس از خالص‌سازی به روش 16S rDNA به عنوان *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* شناخته شد. به دلیل نفت‌خیز بودن ایران، هیدروکربن های نفتی یکی از مهم‌ترین آلاینده های خاک محسوب می‌شوند. این آلاینده‌ها دارای انحلال نسبتاً کمی بوده و دسترسی باکتری‌ها به آنها کم می باشد. یانگ (Yang) و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک گونه از *اسفینگوموناس اس پی* که قادر به تجزیه فنازین-۱-کربوکسیلیک بود را جداسازی نمودند (۲۱). تاکنون مطالعه‌ای در مورد استفاده از گونه‌های *اسفینگوموناس* جهت حذف هگزادکان منتشر نشده است. در مطالعه حاضر یک باکتری مقاوم در برابر شوری که می‌تواند به راحتی در محیط معدنی غنی شده با هگزادکان به عنوان تنها منبع کربن رشد کند، از محیط کمپوست جداسازی گردید. پس از شناسایی باکتری، میزان حذف هگزادکان توسط این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که پس از ۳۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ۴۹/۷ درصد از هگزادکان توسط باکتری مورد مصرف قرار گرفته است به طوری که میزان هگزادکان از ۳۰۰۰ به ۱۵۱۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. از نکات قابل توجه این پژوهش آن بود که *اسفینگوموناس* با این که رشد بسیار خوبی در محیط حاوی هگزادکان داشت، اما تنها قادر به حذف ۴۹/۷ درصد از هگزادکان بود. در پژوهش دیگری که توسط نویسندگان این مقاله صورت گرفت، باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* (*P. aeruginosa*) و *اسینتوباکتر رادیورزیستنس* (*A. radioresistence*) از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی جداسازی شدند (۱۰).

باکتری های مذکور میزان حذف بالاتری نسبت به *اسفینگوموناس* داشتند. این مساله نشان دهنده این است که باکتری‌های تطبیق یافته توانایی بالاتری جهت حذف ترکیبات نفتی دارند. با این حال با سازگار کردن باکتری *اسفینگوموناس* در مدت زمان بیشتر (حدود ۴ ماه)، توانایی آن در حذف هگزادکان ۲۵ درصد افزایش یافت. بر همین اساس ستی (Setti) و همکاران در سال ۱۹۹۳ و ولک سپول ودا



نمودار ۳: رشد باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* در غلظت های مختلف نمک پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری

(Volke-Sepulveda) و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مدت ۳۱ روز به میزان حذف ۳۷ و ۸۶/۴ درصد به ترتیب توسط *آسپرژیلوس نیجر* (*A. niger*) و *سودوموناس* (*Pesudomonas*) دست یافتند (۲۲ و ۲۳). نمک می تواند یکی از عوامل مهم تجزیه زیستی آلاینده ها به وسیله باکتری ها باشد (۲۴). نمک ساختار سلولی را تخریب کرده و موجب نابودی آنزیم های سلولی می گردد (۲۵). بسیاری از خاک های ایران شور یا نیمه‌شور می‌باشند. بنابراین یکی از اهداف این پژوهش بررسی تاثیر نمک بر باکتری بود. نتایج ما نشان داد که *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* می تواند در غلظت نمک ۲/۵ درصد رشد نماید، اما توانایی رشد در غلظت ۵ درصد نمک را ندارد. بنابراین این باکتری مقاوم به شوری یا هالوتولرانت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان می دهد که در شرایط آب و هوایی ایران می توان از باکتری *اسفینگوموناس یانوی‌کویائه* به منظور حذف ترکیبات نفتی به‌ویژه گازوییل استفاده نمود. با این حال افزایش زمان سازگاری موجب افزایش راندمان حذف هگزادکان توسط *اسفینگوموناس* می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Taccari M, Milanovic V, Comitini F, Casucci C, Ciani M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. Int Biodeteriorat Biodegradat. 2012; 66(1): 39-46.
2. Dehghani M, Taatizadeh SB, Samaei MR. Biodegradation of n-hexadecane in *Acinetobacter radioresistens* liquid culture. Health Scop. 2013; 2(3): 162-167.
3. Yang L, Lai CT, Shieh WK. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. Water Res. 2000; 34(13): 3303-3314.
4. Partovinia A, Naeimpoor F, Hejazi P. Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: slurry phase n-hexadecane bioremediation. J Haz Mat. 2010; 181(1-3): 133-139.
5. Samaei MR. 2013. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with hexadecane in slurry bioreactors. Ph.D. Tarbiat Modarres University.
6. Volke-Sepúlveda TL, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. Biores Tec. 2003; 87(1): 81-86.
7. Atlas RM, Hazen TC. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. Env Sci Tec. 2011; 45(16): 6709-6715.
8. Wolicka D, Suszek A, Borkowski A, Bielecka A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Biotec Bioeng. 2009; 100 (13): 3221-3227.
9. Noordman WH, Wachter JHJ, de Boer GJ, Janssen DB. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. J Biotec. 2002; 94(2): 195-212.
10. Samaei MR, Mortazavi SB, Bakhshi B, Jonidi Jafari A. Isolation, genetic identification, and

degradation characteristics of n-hexadecane degrading bacteria from tropical areas in Iran. Fresenius Env Bul. 2013; 22(4): 1304-1312.

11. Vidali M. Bioremediation. an overview. Pur App Chem. 2001; 73(7): 1163-1172.

12. Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. Enz Mic Tec. 2009; 45(3): 195-202.

13. Namkoong W, Hwang EY, Park JS, Choi JY. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Env Pol. 2002; 119(1): 23-31.

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

15. Joseph PJ, Joseph A. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. J Haz Mat. 2009; 161(1): 522-525.

16. Hua X, Wu Z, Zhang H, Lu D, Wang M, Liu Y, Liu, Z. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. Chemospher. 2010; 80(8): 951-956.

17. Leys NMEJ, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top EM, Springael D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. App Env Mic. 2004; 70(4): 1944-1955.

18. Wu J, Ju LK. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. J Biotec. 1998; 59(3): 193-202.

19. Gallego V, Garcia MT, Ventosa A. Methylobacterium adhaesivum sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. Int J Systematic Evolutionary Mic. 2006; 56(2): 339-342.

20. Molina M, Gonzalez N, Bautista L, Sanz R, Simarro R, Sanchez I, Sanz, J. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. Biodegrad. 2009; 20(6): 789-800.

21. Yang CF, Lee CM, Wang CC. Isolation and physiological characterization of the pentachlorophenol degrading bacterium *Sphingomonas chlorophenolica*. Chemospher. 2006; 62(5): 709-714.

22. Setti L, Lanzarini G, Pifferi PG, Spagna G. Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. Chemospher. 1993; 26(6): 1151-1157.

23. Volke Sepulveda T, Gutierrez Rojas M, Favela Torres E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. Biores Tec. 2006; 97(14): 1583-1591.

24. Ulrich A, Guigard S, Foght J, Semple K, Pooley K, Armstrong J, Biggar, K. Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. Biodegrad. 2009; 20(1): 27-38.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 4, January 2014

Original Article

Isolation and molecular identification of n-hexadecan degrading bacteria from compost

Mohammad Reza Samaei[1], Seyed Bagher Mortazavi[2], Bita Bakhshi[3], Ahmad Jonidi Jafari[4], Mina Boostanshenas[5]

[1]Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[2]Associated Professor, Department of Occupational Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Associated Professor, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4] Associated Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[5] MS.c., Antimicrobial Resistance Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Contamination of soil and groundwater by diesel released from underground storage tanks is an important and extensive environmental challenge in Iran. The aim of this study was to isolate and molecular identification of n-hexadecane-degrading bacteria from compost.

Materials and Methods: In this study, hexadecane was used as a model for contamination to diesel oil. We used compost in order to isolate hexadecane degrading bacteria. Then, the selected bacteria was identified using PCR method. Finally, the efficiency of isolated bacteria for consumption of hexadecane as sole source of carbon and the growth rate of the bacteria in different concentrations of NaCl were evaluated.

Results: Based on morphology, biochemical tests and sequencing, the isolated bacteria identified as *Sphingomonas yanoikuyae*. This bacteria could remove 49.69% of n- Hexadecane after 33 days in 30 C. The concentration of n- Hexadecane decreased from 3000 mg to 1510 mg. In addition, the results showed that isolated bacteria can growth on 2.5% salinity.

Conclusion: The results of this study showed that *S. yanoikuyae* can be used in remediation of petroleum products, especially diesel oil, in tropical and semi-salinity area in Iran. Therefore, further investigations using molecular approaches is recommended.

Keywords: Hexadecane, Biodegredation, Molecular detection, *Sphingomonas yanoikuyae*.

Correspondence to: Mohammad Reza Samaei

Tel: +989177320737

E-mail: mrsamaei@sums.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 6(4): 320-327.