



Study of the removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a halotolerant bacteria isolated from Dehloran Oil-contaminated soil

Maryam Firoozbakht¹, Abbas Akhavan Sepahi², Hamid Rashedi³, Fatemeh Yazdian⁴

¹PhD student, Department of Biology, Faculty of convergent sciences and technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ²Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Tehran University, Tehran, Iran. ⁴Associate Professor, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Soil contamination by petroleum compounds and salt often occurs simultaneously. The aim of this study was the isolation of halotolerant bacterial strains with the ability to remove different concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Material and Methods: In the present original study, petroleum-contaminated soil samples were collected from Dehloran area. To isolate bacterial strains degrading PAHs, PAHs- enriched media were used as the sole source of carbon and energy. The ability of the isolates to tolerate different salt concentrations was investigated. Based on its capacity to produce biosurfactants, a suitable bacterial strain was chosen and the biodegradation of various types of PAHs was evaluated. The effects of the molecular weight and initial concentration of different types of PAHs on the strain's cell growth and biodegradation were investigated.

Results: Among the isolates, *Labeledella gwakjiensis* strain KDI, with the ability to grow at concentrations greater than 3% salt and produce biosurfactants, was selected. The results demonstrated that this strain could biodegrade various types of PAHs, and that the molecular weight and initial concentration of PAHs, which have a direct effect on cell growth, indirectly affect the biodegradation rate.

Conclusion: Salt is considered as a deterrent in biodegradation. Hence the use of halotolerant bacterial strains capable of biodegrading PAHs is critical in removing these pollutants from the environment.

Keywords: Halotolerant bacteria, *Labeledella gwakjiensis* strain KDI, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Environment contaminant removal, Biosurfactant.

Received: 23 December 2022

Revised: 9 April 2023

Accepted: 31 May 2023

Correspondence to: Abbas Akhavan Sepahi

Tel: +98 2122949793

E-mail: akhavansepahy@gmail.com

Journal of Microbial World 2023, 16(1): 42 - 58

DOI:10.30495/jmw.2023.1974262.2045



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



مطالعه حذف هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با استفاده از باکتری تحمل کننده نمک جداشده از خاک آلوده به نفت

مریم فیروزبخت^۱، عباس اخوان سپهی^{۲*}، حمید راشدی^۳، فاطمه یزدیان^۴

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۲ دانشیار، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۳ دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ^۴ دانشیار، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی خاک به ترکیبات نفتی و نمک اغلب به‌طور همزمان رخ می‌دهد. هدف از این مطالعه جداسازی سویه‌های باکتریایی تحمل کننده نمک با توانایی حذف غلظت‌های مختلف انواع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) است. **مواد و روش‌ها:** در مقاله تحقیقی حاضر، از خاک آلوده به ترکیبات نفتی دهلران نمونه‌برداری شد. برای جداسازی سویه‌های باکتریایی تجزیه کننده PAHs، از محیط کشت غنی شده با انواع PAHs، به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، استفاده شد. توانایی تحمل سویه‌های باکتریایی جدا شده در غلظت‌های مختلف نمک مورد مطالعه قرار گرفت. سویه باکتریایی مناسب، بر اساس توانایی تولید بیوسورفکتانت، انتخاب و تجزیه زیستی انواع مختلف PAHs توسط این سویه بررسی شد. تاثیر وزن مولکولی و غلظت اولیه انواع مختلف PAHs بر روی رشد سلولی سویه باکتریایی و میزان تجزیه زیستی مطالعه شد. **یافته‌ها:** از میان سویه‌های جداسازی شده، لبدلا گواکجینسیس سویه KDI با توانایی رشد در غلظت بالاتر از ۳ درصد نمک، و تولید بیوسورفکتانت انتخاب شد. نتایج نشان داد، این سویه باکتریایی توانایی تجزیه زیستی انواع مختلف PAHs را داشته و وزن مولکولی و غلظت اولیه PAHs، با تاثیر مستقیم بر روی رشد سلولی، به صورت غیر مستقیم بر میزان تجزیه زیستی تاثیر می‌گذارند. **نتیجه‌گیری:** از آنجا که نمک عامل بازدارنده در تجزیه زیستی است، استفاده از سویه باکتریایی تحمل کننده نمک با توانایی تجزیه زیستی PAHs، اهمیت زیادی در حذف این نوع آلاینده‌ها از محیط زیست دارد. **کلمات کلیدی:** باکتری تحمل کننده نمک، لبدلا گواکجینسیس سویه KDI، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، آلاینده‌های زیستی، بیوسورفکتانت.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۱/۲۰

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۲

مقدمه

هستند که به دو دسته، با وزن مولکولی پایین (دارای دو یا سه حلقه آروماتیک) و وزن مولکولی بالا (دارای چهار یا تعداد بیشتر حلقه آروماتیک) تقسیم می‌شوند که با افزایش وزن مولکولی به علت افزایش پایداری‌شان، سمیت آن‌ها نیز افزایش می‌یابد (۱). همچنین به علت حلالیت کم، خاصیت آب‌گریزی زیاد، نقطه ذوب و جوش بالا و فشار بخار کم، این ترکیبات

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs)، گروهی از ترکیبات آلی آب‌گریز با ساختاری متشکل از اتم‌های کربن و هیدروژن

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱۲۲۹۴۹۷۹۳
پست الکترونیک: akhavansepahy@gmail.com



قم را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند، با افزایش غلظت فناترن، میزان تجزیه زیستی آن کاهش می‌یابد (۱۱). قربان نژاد (Ghorbannezhad) و همکارانش در سال ۲۰۲۲ به مطالعه تجزیه زیستی پیرن با استفاده از سویه باکتریایی هالوتولرننت جدا شده از منطقه نفتی شهر پرداختند. آن‌ها نشان دادند که تجزیه زیستی PAHs با وزن مولکولی بالا، در حضور نمک پیچیده است و تنها ۵۵/۵ درصد از ۵۰۰ppm پیرن توسط سویه باکتریایی HG 01، تجزیه شد (۱۲). رحیمی و همکارانش در سال ۱۳۹۹ نشان دادند که مخلوط میکروبی متشکل از ۶ سویه باکتریایی و یک قارچ، توانایی تجزیه ۸۷٪ از ۲۰۰ppm از فلورن را دارد (۱۳). میدان نفتی دهلران، یکی از میداین نفتی ایران است که با میدان نفتی ابوغریب در عراق دارای مخزن مشترک است و در ۲۲ کیلومتری جنوب غربی دهلران در استان ایلام واقع شده است. این میدان نفتی از جمله میداین فعال استخراج نفت است که سالانه ۶۰۰۰ تن نفت خام را استخراج و به بازارهای داخلی و خارجی عرضه می‌کند. از آنجایی که فرآیند استخراج نفت، باعث ایجاد آلودگی آب و خاک محل بهره برداری با ترکیبات نفتی می‌شود، بنابراین حذف این دسته از آلاینده‌های زیستی به منظور حفظ محیط زیست، از ضروریات به شمار می‌آید. اگرچه تحقیقات متعددی به منظور بررسی میزان تاثیر باکتری‌ها در تجزیه PAHs در خاک‌های آلوده به نفت انجام شده است، اما مطالعات بسیار اندکی در زمینه استفاده از باکتری‌های بومی تحمل‌کننده نمک صورت گرفته است. از سوی دیگر، پژوهشی در زمینه جداسازی باکتری‌ها با توانایی تجزیه ترکیبات نفتی از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی دهلران و تلاش به منظور پاک‌سازی خاک آلوده به ترکیبات نفتی این منطقه صورت نگرفته است. هدف از انجام این پژوهش، جداسازی باکتری تحمل‌کننده نمک از خاک شور آلوده به ترکیبات نفتی دهلران و سپس ارزیابی توانایی سویه باکتریایی جدا شده در تجزیه غلظت‌های مختلف انواع PAHs با وزن مولکولی متفاوت است. همچنین تاثیر وزن مولکولی و نوع PAHs به عنوان پارامترهای اثرگذار بر میزان تجزیه زیستی PAHs مطالعه شد.

می‌توانند به مدت طولانی در خاک باقی بمانند (۲). آلودگی مرتبط با PAHs، یا از طریق راه‌های طبیعی مانند فوران آتشفشان و یا از طریق فعالیت‌های انسانی مانند استفاده از سوخت‌ها و یا آلودگی‌های مرتبط با استخراج مواد نفتی است. به علت ساختار پیچیده ماتریکس خاک، بیشترین میزان آلودگی‌های مرتبط با PAHs، مربوط به خاک است (۳). همچنین مطابق مطالعات صورت گرفته در زمینه PAHs، فناترن و پیرن به‌عنوان رایج‌ترین آلاینده‌های خاک، در نظر گرفته شده‌اند (۴). این ترکیبات مضر به علت ماهیت پایدار و مقاوم شان در طبیعت، دارای ویژگی‌های نوروکسیک، موتاژنیک بوده و می‌توانند مشکلات جدی برای سلامت انسان‌ها و حیوانات به وجود آورند (۵). در میان روش‌های مختلف برای حذف PAHs، تجزیه زیستی به معنای استفاده از میکروارگانیسم‌ها، به علت صرفه اقتصادی، کارآمدی و نداشتن آلودگی ثانویه کارایی موثرتری دارد (۶). میکروارگانیسم‌ها با اتصال محکم به آلاینده‌هایی نظیر انواع PAHs، دسترسی زیستی آن‌ها و به دنبال آن تجزیه زیستی این دسته از ترکیبات را تقویت می‌کنند (۷). در میان میکروارگانیسم‌های شناخته شده، باکتری‌ها به علت داشتن ویژگی‌هایی نظیر زندگی آزاد و تنوع گسترده، گروه غالب در میان تجزیه‌کنندگان هیدروکربن‌ها هستند (۸). از طرفی، آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی به ترکیبات نفتی و نمک، اغلب بطور همزمان در مناطق تحت فعالیت‌های نفتی رخ می‌دهد (۹). مطالعات زیادی نشان می‌دهد که حضور نمک در محیط آب و خاک به علت کاهش قابلیت دسترسی PAHs برای میکروارگانیسم‌ها، از عوامل محدودکننده تجزیه زیستی این ترکیبات به شمار می‌رود. به همین دلیل، امروزه باکتری‌های تحمل‌کننده نمک (Halotolerant)، به علت توانایی و نقش‌شان در انجام مکانیسم‌های اصلاح زیستی مرتبط با آلاینده‌های پایدار محیط زیست، در زیست فناوری مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند (۱۰).

پوربابایی (Pourbabae) و همکارانش در پژوهشی در سال ۲۰۱۹، تاثیر غلظت اولیه فناترن بر میزان تجزیه زیستی آن توسط سویه باکتریایی هالوتولرننت جدا شده از منطقه سراج

مواد و روش‌ها

(ZnSO₄.7H₂O)، ۰/۰۲ گرم در لیتر کلرید کلسیم ۶ آب به (COCL₂.6H₂O)، ۰/۰۰۶ گرم در لیتر سدیم مولیدات ۲ آب به (Na₂MOO₄) و ۰/۰۰۱ گرم در لیتر سولفات مس ۲ آب به (CuSO₄.2H₂O) است. لازم به ذکر است به منظور جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک، به میزان ۳ درصد نمک نیز به محیط کشت مذکور اضافه و سپس با استفاده از HCl و NaOH، pH آن بر روی ۰/۲ ± ۷ تنظیم و در نهایت در دستگاه اتوکلاو استریل شد (۱۵).

د) غنی‌سازی محیط کشت با هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای: به منظور جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs، انواع مختلف PAHs از جمله نفتالن، فناترن و پیرن در حلال مناسب حل و به محیط کشت نمک‌های معدنی اضافه شدند. به این منظور ابتدا محلول ۱ درصد نفتالن در استن، ۱ درصد فناترن در استن و ۱ درصد پیرن در دی کلرومتان تهیه و با استفاده از فیلترهای مخصوص (hydrophobic PTFE membrane filters) استریل شدند. سپس به میزان ۱ میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های تهیه شده به فلاسک‌های استریل با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر اضافه و به‌منظور تبخیر حلال، فلاسک موردنظر در زیر هود لامینار قرار داده شد. بعد از تبخیر حلال، به لایه نازک تشکیل شده از هریک از PAHs، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت نمک‌های معدنی که حاوی ۳ درصد نمک بود، اضافه شد تا غلظت نهایی PAHs در داخل هر فلاسک به ۱۰۰ ppm برسد. به منظور غنی‌سازی محیط کشت، ۵ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک به هریک از فلاسک‌ها اضافه شد. سپس فلاسک‌ها در دستگاه شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۲۰ rpm در شرایط تاریکی به مدت ۲ هفته گرمخانه‌گذاری شدند (۱۶).

بعد از دو هفته گرمخانه‌گذاری، ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی هر فلاسک به فلاسکی جدید با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت نمک‌های معدنی تازه که با ۳ درصد نمک و ۱۰۰ ppm از هر PAHs (نفتالن، فناترن و پیرن) به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی موجود در محیط کشت جایگزین شده بود، منتقل شد و مجدداً فلاسک‌ها در شرایط

الف) جمع‌آوری نمونه و تعیین خصوصیات شیمیایی آن: به منظور جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک که توانایی تجزیه PAHs را داشته باشند، از خاک ۱۰ ناحیه مختلف با سابقه آلودگی طولانی مدت به ترکیبات نفتی، در اطراف میدان نفتی دهلران نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای درب دار استریل جمع‌آوری و با حفظ شرایط دمایی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور تعیین خصوصیات شیمیایی خاک جمع‌آوری شده، pH خاک با استفاده از دستگاه pH متر و هدایت الکتریکی (EC) (Electrical conductivity) آن با دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که مطابق با استاندارد ISO-11265:1994، به میزان ۱ گرم از نمونه خاک خشک با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به خوبی مخلوط و فیلتر شد و سپس مورد آزمایش قرار گرفت (۱۴).

ب) مواد مورد نیاز: تمامی مواد مورد استفاده در این پژوهش از جمله اجزای تشکیل دهنده محیط کشت نمک معدنی (Mineral Salt Medium) و همچنین هیدروکربن‌های پلی آروماتیک و تمامی مواد شیمیایی از جمله حلال‌های آلی از شرکت (Merck) با درجه خلوص high-performance liquid chromatography (HPLC)، تهیه شدند. کیت استخراج DNA از شرکت (سینا کلون) و پرایمرهای استفاده شده از شرکت (Metabion International AG) تهیه شدند.

ج) ساخت محیط کشت نمک‌های معدنی: به منظور جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs، محیط کشت نمک‌های معدنی با استفاده از ۶/۳ گرم در لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K₂HPO₄)، ۱/۸ گرم در لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH₂PO₄)، ۰/۱ گرم در لیتر منیزیم سولفات ۷ آب (MgSO₄.7H₂O)، ۰/۱ گرم در لیتر کلرید کلسیم (CaCl₂.H₂O)، ۰/۱ گرم در لیتر فروس سولفات ۷ آب (FeSO₄.7H₂O)، ۰/۱ گرم در لیتر سولفات منگنز (MnSO₄.H₂O) و ۱ میلی‌لیتر محلول عناصر کمیاب (Trace element solution) که شامل ۰/۰۳ گرم در لیتر بوریک اسید (H₃BO₃)، ۰/۰۱ گرم در لیتر زینک سولفات ۷ آب

بیوسورفکتانت در سویه‌های جداسازی شده با کمک اندازه‌گیری کشش سطحی (surface Tension) و خاصیت امولسیفیکاسیون (Emulsification Index: E24) آن‌ها، به‌عنوان شاخص‌های تایید‌کننده تولید بیوسورفکتانت، بررسی شد (۲۰). به این منظور، سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه زیستی PAHs، که در مراحل قبل جداسازی شده بودند، بر روی محیط کشت نمک‌های معدنی که با ۱۰۰ ppm از فناترن و ۳ درصد نمک جایگزین شده بود، کشت داده شدند. همچنین از همین محیط کشت نمک‌های معدنی بدون تلقیح سویه (uninoculated) به‌عنوان کنترل استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت امولسیفیه‌کنندگی از روشی که توسط کوپر و گلدنبرگ (Cooper و Goldenberg) شرح داده شده است، استفاده شد. خاصیت امولسیفیکاسیون Emulsification index (E24) با کمک اندازه‌گیری پتانسیل امولسیفیکاسیون سوپرناتانت کشت هر کدام از سویه‌ها، اندازه‌گیری شد. به این منظور، ۶ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد فناترن در استن به‌عنوان PAHs و ۴ میلی‌لیتر از سوپرناتانت فاقد سلول باکتری (cell-free supernatants) در یک لوله در پیچ دار ریخته و در دور بالا به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد و سپس برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، نگهداری شد (۲۱). بعد از سپری شدن مدت زمان گفته شده، طول کل ستون مایع و طول لایه امولسیفیه شده اندازه‌گیری و سپس درصد فعالیت امولسیفیکاسیون از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{ارتفاع لایه امولسیفیه شده} \times 100 = \frac{\text{ضریب امولسیفیکاسیون}}{\text{ارتفاع کل ستون}}$$

کشش سطحی به روش Du Nouy Ring Method و با استفاده از دستگاه تنسیومتر مدل DCAT، اندازه‌گیری شد (۲۲). به‌منظور اندازه‌گیری کشش سطحی، محیط کشت حاوی هر یک از سویه‌های جدا شده در مرحله قبل با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصل، فیلتر شده و میزان کاهش کشش سطحی آن توسط دستگاه

قبلی در انکوباتور گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت یک هفته، به منظور جداسازی سویه‌های باکتریایی رشد کرده در محیط کشت نمک‌های معدنی، از محتویات هر فلاسک رقت‌های سریال تهیه و سپس به محیط کشت نمک‌های معدنی جامد که حاوی ۳ درصد نمک بود و با PAHsهای مختلف با غلظت ۱۰۰ ppm پوشیده شده بود، منتقل شدند (۱۷). پس از رشد سویه‌های باکتریایی، به منظور دستیابی به سویه‌های خالص، هر سویه باکتریایی چندین بار بر روی محیط کشت نمک‌های معدنی آگار حاوی ۳ درصد نمک و غلظت ۱۰۰ ppm از PAHs، کشت مجدد داده شد. به منظور حفاظت از سویه‌های باکتریایی جدا شده، کشت خالص آن‌ها در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره‌سازی شد.

ه) غربالگری سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs: از آنجایی که هدف این پژوهش، مطالعه توانایی سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک در تجزیه زیستی PAHs است، و از آنجایی که فناترن دارای ویژگی‌های شاخص هیدروکربن‌ها بوده و در خاک‌های آلوده به نفت به صورت گسترده شناسایی شده است (۱۸)، از آن به‌عنوان مدل برای مطالعات مرتبط با PAHs استفاده می‌شود. به منظور اطمینان از تحمل‌کننده نمک بودن سویه‌های باکتریایی، و همچنین به منظور بررسی بیشینه غلظت نمک که هر سویه توانایی تحمل آن را دارد، توانایی رشد سویه‌های باکتریایی مختلف جدا شده در مرحله قبل در محیط کشت نمک‌های معدنی آگار حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ درصد) و غلظت ۱۰۰ ppm از فناترن بررسی شد. در نهایت سویه‌هایی که توانایی رشد در حضور مقادیر بیشتر از ۳ درصد نمک را داشتند، به‌عنوان سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه زیستی PAHs، برای ادامه پژوهش انتخاب شدند. (و) ارزیابی توانایی تولید بیوسورفکتانت در سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs: پژوهش‌های گذشته نشان داده است که بیوسورفکتانت‌ها از طریق افزایش دسترسی زیستی PAHs سبب افزایش میزان تجزیه زیستی آن‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (۱۹). به این منظور توانایی تولید

دقیقه، دناتوراسیون (denaturation) در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طولی شدن یا امتداد (extension) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه (۳۵ سیکل) و طولی شدن یا امتداد نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. به منظور بررسی و مشاهده کیفیت قطعات تکثیر شده DNA، الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و سپس باندهای مجزا زیر اشعه ماورابنفش مشاهده شدند. بعد از اطمینان از کیفیت مناسب، محصول PCR به منظور توالی‌یابی به شرکت Bioneer فرستاده شد. بعد از مشخص شدن نتیجه توالی‌یابی، توالی از نظر شباهت ابتدا در EzBioCloud مورد شناسایی اولیه قرار گرفت و سپس با استفاده از برنامه BLASTn با داده‌های ثبت شده سایت مرکز ملی اطلاعات بیولوژیکی the National Center for Biotechnology Information (NCBI) مقایسه و ثبت شد. همچنین درخت فیلوژنی با استفاده از روش neighbor-joining با استفاده از نرم افزار Mega 11 بر پایه ۵۰۰ تکرار (bootstrap) رسم شد.

ح) بررسی تاثیر PAHs های مختلف بر روی رشد سلولی سویه منتخب: در این مرحله به منظور بررسی تاثیر استفاده از PAHs مختلف بر روی سویه منتخب، از محیط کشت نمک‌های معدنی که با ۵ درصد از مایه تلقیح، ۳ درصد نمک و غلظت ثابتی (۱۰۰ ppm) از نفتالن، فناترن و پیرن بطور جداگانه، جایگزین شده بود، استفاده شده و به مدت یک هفته میزان رشد سلولی سویه مورد نظر با کمک اندازه‌گیری جذب نوری (OD) در طول موج ۶۰۰nm مورد مطالعه قرار گرفت.

ط) بررسی رشد و توانایی تجزیه سویه منتخب بر روی غلظت‌های مختلف نفتالن، فناترن و پیرن: به منظور بررسی رشد و توانایی تجزیه باکتری منتخب، از غلظت‌های مختلف نفتالن، فناترن و پیرن استفاده شد. به این منظور از فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نمک‌های معدنی استریل با pH: ۷-۷/۲ استفاده شد. به میزان ۵ درصد (v/v) حجم محیط کشت، از کشت تازه باکتری منتخب

تسنیومتر هر ۲۴ ساعت به مدت ۱۲۰ ساعت اندازه‌گیری شد. همچنین با اندازه‌گیری جذب نوری (Optical Density) یا OD در ۶۰۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری مدل Agilent، ارتباط میان کشش سطحی و رشد سلولی سویه‌های منتخب در محیط کشت نمک‌های معدنی جایگزین شده با ۱۰۰ppm از فناترن و ۳ درصد نمک، اندازه‌گیری شد.

ز) شناسایی سویه باکتریایی انتخاب شده: در آزمایش‌های ریخت شناسی (مورفولوژیکی)، خصوصیات کلی باکتری‌ها بر روی محیط کشت از نظر شکل کلنی، اندازه، سطح، رنگ، قوام، شفافیت ارزیابی شد و مشخص شد که هر کلنی مربوط به باکتری خاصی می‌باشد که در محیط کشت با ظاهر ویژه‌ای ظاهر می‌گردد. همچنین، بررسی خصوصیات میکروسکوپی هر باکتری با توجه به شکل و آرایش آن‌ها با کمک رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. بررسی واکنش‌های شیمیایی به‌منظور شناسایی اولیه سویه باکتریایی منتخب انجام شد و در پایان برای اطمینان از نتایج، DNA ژنومی سویه‌ای که بیشترین توانایی در تجزیه PAHs را داشت به روش مولکولی، با استفاده از کیت استخراج و سپس توسط PCR با استفاده از دو پرایمر universal که در جدول ۱ آورده شده اند، تکثیر شد (۲۳).

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای ۱۶S rDNA برای انجام PCR.

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه (bp)	جذب نوری (nm)
۲۷F	(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	۵۳۸	۸/۲۲
۱۴۹۲R	(5'-GGTTACCTGTGTACACTT-3')	۴۴۸	۸/۲۲

مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر از ترکیب ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس (Master Mix)، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۹/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، تهیه شد. در کنترل منفی بجای DNA نمونه، به همان میزان آب مقطر استفاده شد. سیکل حرارتی استفاده شده شامل مراحل دناتوره شدن، جفت شدن و پلیمراسیون بصورت زیر طراحی شد. ابتدا دناتوراسیون اولیه (predenaturation) در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳

شد: (OD600nm=0.2)، تلقیح و فلاسک‌ها در شیکر انکوباتور با

$$۱۰۰ \times \frac{\text{غلظت نهایی غلظت اولیه}}{\text{غلظت اولیه}} = \text{میزان تجزیه زیستی}$$

یافته‌ها

الف) خصوصیات شیمیایی خاک جمع‌آوری شده: نتایج نشان داد که میزان pH و هدایت الکتریکی خاک آلوده به نفت دهلران، به ترتیب برابر ۷/۸ و ۰/۳۳۴ (mS/cm) است.

ب) جداسازی و شناسایی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs: بعد از استفاده از محیط کشت مایع نمک‌های معدنی و انجام کشت خطی بر روی محیط کشت نمک‌های معدنی آگار که حاوی ۳ درصد نمک بود و با نفتالن، فناترن و پیرن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی پوشیده شده بود، ۱۲ جدایه باکتری متفاوت به دست آمد.

ج) انتخاب سویه‌های باکتریایی تحمل‌کننده نمک: از آنجایی که هدف این پژوهش جداسازی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک بود، و به همین دلیل برای جداسازی سویه‌های باکتریایی از محیط کشت حاوی نمک استفاده شده بود، بنابراین انتظار می‌رفت سویه‌های جدا شده توانایی رشد بر روی غلظت‌های مختلف نمک را داشته باشند. در میان ۱۲ سویه باکتری جدا شده، سویه‌هایی که توانایی رشد در محیط فاقد نمک را نداشتند به عنوان سویه‌های هالوفیل حذف شدند و تنها ۴ سویه باکتریایی که توانایی رشد در غلظت بیشتر از ۳ درصد نمک را داشتند برای مرحله بعد انتخاب شدند. لازم به ذکر است که تمامی سویه‌های انتخاب شده توانایی رشد در حضور نمک تا غلظت ۹ درصد را نیز داشتند.

د) غربالگری سویه‌های دارای توانایی تجزیه PAHs از میان جدایه‌ها: نتایج حاصل از اندازه‌گیری کشش سطحی و خاصیت امولسیفیکاسیون ۴ سویه باکتری مورد نظر در جدول ۲ نشان داده شده است. در میان ۴ سویه بررسی شده، سویه KDI بر اساس توانایی کاهش کشش سطحی و خاصیت امولسیفیکاسیون، به عنوان سویه کارآمد در تجزیه PAHs انتخاب شد. سویه KDI، توانایی کاهش کشش سطحی محیط کشت را به میزان ۲۶/۶۰ mN/m در مدت زمان ۴۸ ساعت

دور rpm ۱۲۰ در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور ارزیابی کارآمدی تجزیه زیستی PAHs، و سنجش هرگونه حذف غیرزیستی، محیط کشت نمک‌های معدنی غنی شده با غلظت‌های مختلف PAHs اما فاقد مایه تلقیح، نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. رشد باکتریایی با کمک اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر به مدت ۳۰ روز، بررسی شد. تمامی آزمایش‌ها برای سه مرتبه تکرار شدند (۲۴).

ی) اندازه‌گیری میزان تجزیه زیستی PAHs: به منظور اندازه‌گیری میزان تجزیه زیستی PAHs، و محاسبه میزان PAHs باقی‌مانده، نمونه‌ها ابتدا در دور ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا بیومس جدا شود. سپس سوپرناتانت فاقد سلول سه مرتبه با استفاده از دی کلرومتان به عنوان حلال به میزان سه برابر حجم سوپرناتانت استخراج شد. به منظور حذف آب، عصاره‌های حاصل از استخراج با سدیم سولفات بدون آب ترکیب و به منظور حذف بقایای آلودگی، فیلتر شدند و سپس با کمک دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس حلال تبخیر شد. رسوب حاصل از تبخیر حلال در ۲ میلی‌لیتر هگزان حل شده و برای بررسی از دستگاه کروماتوگرافی گازی با دتکتور FID استفاده شد. میزان تجزیه زیستی PAHs با دستگاه کروماتوگرافی گازی با ستون (BP5 model, 30m long × 0.25mm diameter × 0.25µm thick) با شرایط زیر بررسی شد: دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، و از ۶۰ درجه سلسیوس به ۱۸۰ درجه سلسیوس بصورت ۳ درجه سلسیوس در دقیقه افزایش یافت، و سپس به صورت ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۹۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما باقی ماند. دمای اینجکتور و دکتور به ترتیب بصورت ۲۸۰ درجه سلسیوس و ۲۹۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. از گاز نیتروژن با جریان ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد.

درصد تجزیه زیستی PAHs با استفاده از فرمول زیر محاسبه

جدول ۲: کشش سطحی و خاصیت امولسیفیکاسیون چهار سویه باکتریایی تحمل‌کننده نمک.

سویه	کشش سطحی (زمان صفر)	کشش سطحی (۲۴ ساعت)	کشش سطحی (۴۸ ساعت)	کشش سطحی (۷۲ ساعت)	کشش سطحی (۹۶ ساعت)	کشش سطحی (۱۲۰ ساعت)	شاخص امولسیفیکاسیون (درصد)
BDI	۶۶/۴۳	۵۷/۳۲	۴۰/۷۵	۳۲/۲۲	۳۳/۷۳	۳۲/۱۸	۲۲/۸۲
DDI	۶۵/۸۳	۴۲/۳۳	۳۱/۵۶	۲۸/۰۵	۲۸/۱۲	۲۸/۶۵	۶۶/۴۵
IDI	۶۷/۱۲	۶۲/۱۸	۶۲/۲۷	۵۹	۵۸/۱۲	۵۹/۰۴	۴۵
KDI	۶۵/۴۲	۴۲/۱۵	۲۶/۶۰	۲۶/۸۴	۲۷/۱۳	۲۷/۲۴	۸۱/۰۴

شد که این سویه باکتریایی، گرم مثبت، غیر متحرک و میل‌های است.

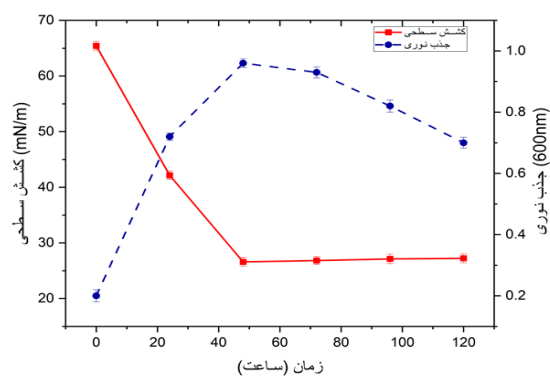
از نظر تست‌های بیوشیمیایی اکسیداز، اوره‌آز، تخمیر گلوکز و تولید اندول، منفی بود اما توانایی هیدرولیز ژلاتین و نشاسته را داشت. سویه KDI، تحمل‌کننده نمک بوده که توانایی رشد بر روی غلظت‌های مختلف نمک تا ۹ درصد را نشان داد. دمای بهینه رشد این سویه باکتریایی ۳۰ درجه سلسیوس بود اما توانایی رشد تا بیشینه دمای ۳۷ درجه سلسیوس را هم داشت.

بر پایه مقایسه توالی 16s rRNA سویه باکتریایی KDI، این سویه با درصد تشابه ۷/۹۹ درصد به عنوان *Labedella gwakjiensis* (۲۵). در شکل ۲، درخت فیلوژنتیکی روابط سویه KDI با سایر سویه‌های باکتریایی، با ضریب bootstrap ۵۰۰ و حضور عنوان گروه خارجی (outgroup)، نشان داده شده است. همچنین توالی ژنی این سویه باکتریایی در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی MW199133 به ثبت رسیده است.

(ز) تاثیر PAHs های مختلف در غلظت ثابت بر روی رشد سلولی سویه باکتریایی KDI: نتایج نشان داد که PAHs در غلظت ثابت (۱۰۰ ppm) اما با وزن مولکولی مختلف، بر روی میزان رشد سلولی سویه منتخب تاثیر دارند (شکل ۳). به طوری که میزان رشد سلولی سویه باکتریایی KDI، در حضور نفتالن با وزن مولکولی ۱۲۸/۱۷ گرم بر مول و دارا بودن دو حلقه بنزنی، بیشتر از فنانترن با وزن مولکولی ۱۷۸/۲۳ گرم بر مول و سه حلقه بنزنی بوده و در حضور فنانترن بیشتر از پیرن با وزن

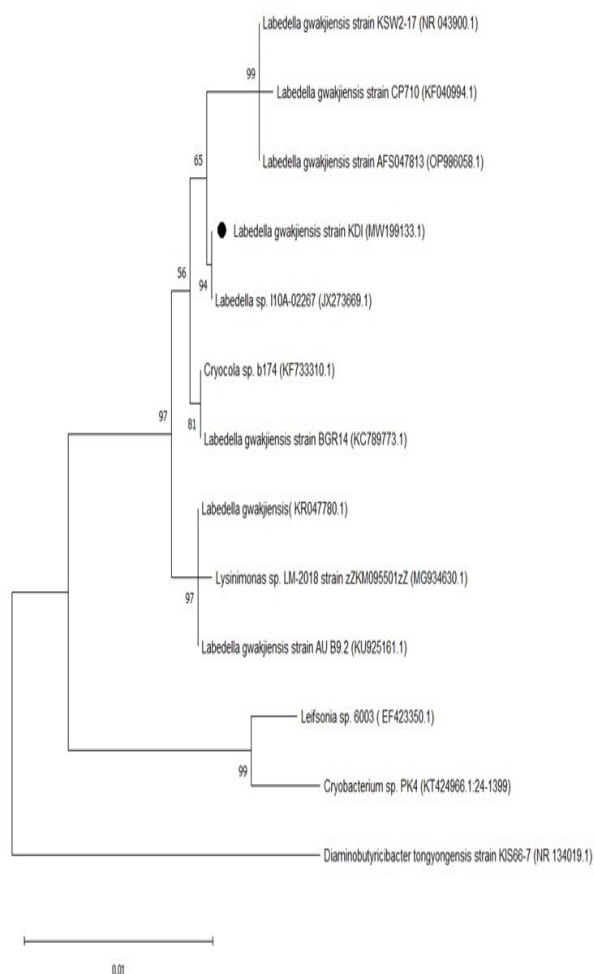
داشت. خاصیت امولسیفیکاسیون کشت فاقد سلول سویه KDI بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با گذشت ۲۴ ساعت، ۸۱/۰۴ درصد بود که به مدت ۷۲ ساعت پایدار ماند.

ارتباط میان رشد سلولی و کشش سطحی: در شکل ۱ ارتباط میان OD به عنوان شاخص رشد سلولی و کاهش کشش سطحی به عنوان شاخص تولید بیوسورفکتانت، در سویه باکتریایی KDI که در حضور ۱۰۰ ppm فنانترن و ۳ درصد نمک رشد کرده است، نشان داده شده است که مطابق آن، با افزایش تراکم سلولی میزان کشش سطحی کاهش می‌یابد.

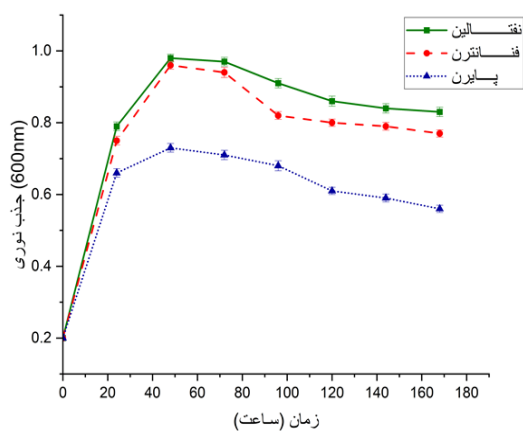


شکل ۱: ارتباط میان رشد سلولی (OD) و کشش سطحی (ST) در حضور ۱۰۰ ppm فنانترن و ۳ درصد نمک در سویه KDI.

(و) شناسایی سویه باکتریایی منتخب: سویه باکتریایی KDI با توانایی تجزیه PAHs، از خاک آلوده به ترکیبات نفتی شهر دهلران جدا شد. کلنی‌های این سویه از نظر ظاهری زرد رنگ، گرد با سطح صاف بودند و با کمک رنگ آمیزی گرم مشخص



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک توالی‌های ژن rRNA S ۱۶ سویه KDI با روش neighbor-joining.



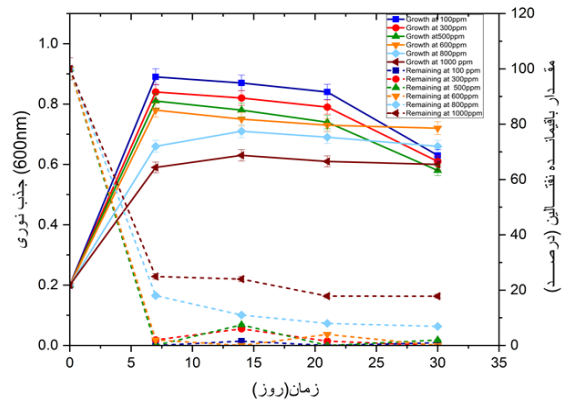
شکل ۳: تاثیر غلظت ثابت از سه PAHs مختلف بر روی میزان رشد سلولی لبدلا گواکجینسیس سویه KDI.

مولکولی ۲۰۲/۲۵ گرم بر مول با چهار حلقه بنزنی است. با این حال بیشترین میزان رشد سلولی در حضور هر سه PAHs، در روزهای ابتدایی رشد دیده شد.

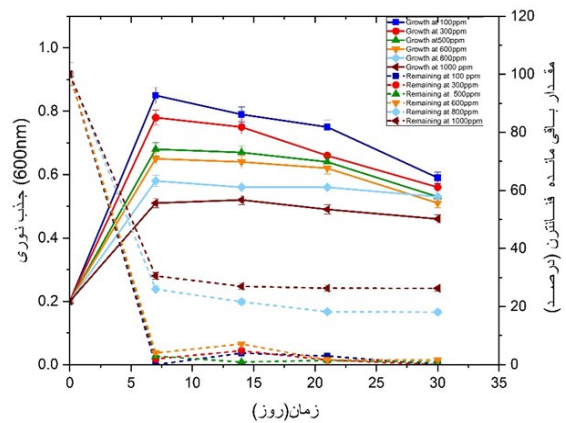
ح) تاثیر غلظت‌های اولیه نفتالن، فنانترن و پایرن بر تجزیه زیستی آن‌ها و ارتباط آن با رشد سلولی سویه KDI: با استفاده از محیط کشت نمک‌های معدنی که با غلظت‌های مختلف نفتالن، فنانترن و پایرن به صورت جداگانه و ۳ درصد نمک، جایگزین شده بود، میزان تاثیر غلظت‌های مختلف PAHs (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ ppm) بر روی رشد سلولی سویه KDI و تجزیه آن‌ها بررسی شد. بعد از گذشت ۳۰ روز از زمان گرمخانه‌گذاری، میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌های مختلف در غلظت‌های مشابه و همچنین میزان تجزیه زیستی یک نوع هیدروکربن اما در غلظت‌های مختلف متفاوت بود به طوری که میزان تجزیه زیستی هر یک از PAHs توسط سویه باکتریایی با افزایش غلظت آن‌ها، کاهش یافت. بعد از گذشت ۳۰ روز، میزان تجزیه زیستی نفتالن در غلظت‌های ۶۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰ به میزان ۱۰۰ درصد بود اما این میزان در غلظت‌های ۱۰۰۰ ppm و ۸۰۰ به ترتیب به ۹۳/۱۲ و ۸۲/۱۹ کاهش یافت. در حضور ۱۰۰ و ۳۰۰ ppm از فنانترن، بعد از گذشت ۳۰ روز از زمان گرمخانه‌گذاری، میزان تجزیه زیستی ۱۰۰ درصد بود اما این مقدار با افزایش غلظت اولیه فنانترن به ۱۰۰۰ ppm و ۸۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، در مدت زمان مشابه به ترتیب به ۹۹/۲۳، ۹۸/۴۵، ۸۱/۹۲ و ۷۳/۷۱ درصد کاهش یافت. همچنین در مدت ۳۰ روز، میزان تجزیه زیستی در حضور ۱۰۰۰ ppm و ۸۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰ از پایرن به ترتیب ۴۵/۲۸، ۴۲/۳۲، ۳۳/۲۳، ۳۱/۲۴، ۲۹/۲۲ و ۲۵/۴۳ بود. مطابق نتایج به دست آمده در حضور غلظت مشخصی از PAHs (نفتالن، فنانترن و پایرن) در روزهای ابتدایی گرمخانه‌گذاری، رشد سلولی افزایش یافت و بعد از آن با روندی آهسته کاهش یافت. همچنین بررسی‌ها نشان داد که بیشترین میزان رشد سلولی در هر سه نوع PAHs (نفتالن، فنانترن و پایرن) با افزایش غلظت آن‌ها، کاهش می‌یابد (شکل‌های ۴، ۵، ۶).

بحث

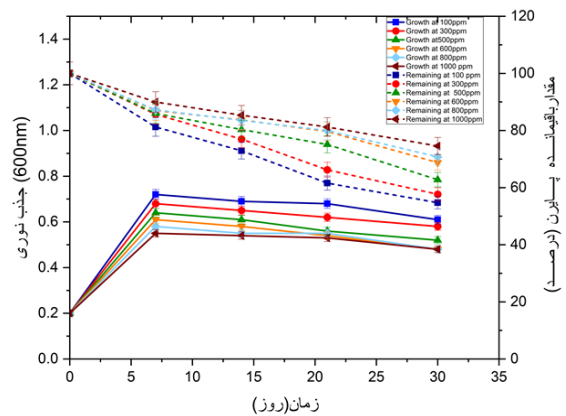
PAHs در حدود ۳۰ درصد از نفت خام را تشکیل می‌دهند و به علت پایداری زیاد، جزء آلاینده‌های محیطی مهم بوده و همچنین به علت اثرات جهش‌زا، سرطان‌زا، سمیت زیاد و پراکندگی زیاد در هوا، آب، خاک و رسوبات؛ تهدید کننده حیات جانداران به شمار می‌آیند. بنابراین، استفاده از فناوری مناسب برای حذف این دسته از آلاینده‌ها، هم از نظر حفظ محیط زیست و هم از نظر حفظ سلامت موجودات زنده اهمیت ویژه‌ای دارد (۲۶). علاوه بر این، از آنجاکه کشور ما ایران، سرشار از منابع نفتی است و فعالیت‌های صنعت نفت از اکتشاف و تولید تا انتقال و حمل فرآورده‌های نفتی در کل کشور به طور گسترده در حال انجام است، احتمال نشت ترکیبات نفتی به محیط در اثر حوادث و نواقص فرآیندی وجود دارد. نکته قابل توجه دیگر وسعت مناطق شور در کشور و هم‌پوشانی آن از نظر جغرافیایی با مناطق نفت‌خیز است. به این صورت که شکل‌گیری سازه‌های نفتی در ارتباط با مناطق شور بوده و بسیاری از فعالیت‌های صنعت نفت مثل حفاری، انتقال و پالایش نفت در اینگونه مناطق انجام می‌شوند و همواره احتمال آلودگی وجود دارد. همچنین بسیاری از پساب‌ها و دورریزهای صنعتی حاوی مقادیر بالای نمک هستند و پاکسازی اینگونه سایت‌های آلوده با روش‌های متداول مقدور نبوده و نیازمند استفاده از میکروارگانیسم‌های تحمل‌کننده نمک است. با توجه به مطالب گفته شده برای حفاظت از محیط زیست کشورمان، حذف این دسته از ترکیبات با کمک میکروارگانیسم‌های بومی تحمل‌کننده نمک از ضروریات است. با وجود تحقیقات انجام شده در زمینه باکتری‌های دارای توانایی تجزیه زیستی PAHs، یافته‌ها درباره توانایی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک در تجزیه زیستی این دسته از ترکیبات، بسیار کم است. این پژوهش بر آن بود تا برای نخستین بار سویه‌های باکتریایی بومی تحمل‌کننده نمک با توانایی تجزیه PAHs را از خاک آلوده به ترکیبات نفتی منطقه دهلران جداسازی کرده و سطحی و شاخص امولسیفیکاسیون، سویه مناسب را انتخاب و



شکل ۴: تجزیه زیستی غلظت‌های مختلف نفتالن و ارتباط آن با میزان رشد سلولی (OD) در حضور لبدلا گواکجینسیس سویه KDI.



شکل ۵: تجزیه زیستی غلظت‌های مختلف فنانترن و ارتباط آن با میزان رشد سلولی (OD) در حضور لبدلا گواکجینسیس سویه KDI.



شکل ۶: تجزیه زیستی غلظت‌های مختلف پیرن و ارتباط آن با میزان رشد سلولی (OD) در حضور.

بیشترین میزان کاهش کشش سطحی در زمان ۴۸ ساعت اتفاق افتاد که با فاز رشد لگاریتمی باکتری ارتباط دارد. این نتایج با مطالعات گذشته که نشان می‌دهند بیشترین میزان کاهش کشش سطحی به علت تولید بیوسورفکتانت، در فاز لگاریتمی رشد باکتری اتفاق می‌افتد و تولید بیوسورفکتانت توسط میکروارگانیسم‌ها باعث کاهش کشش سطحی شده و دسترسی میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات آب‌گریز مانند PAHs را افزایش می‌دهد تا جذب و متابولیسم شوند، انطباق دارد (۲۸). آقایی و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که سویه‌های با توانایی تولید بیوسورفکتانت، کشش سطحی را به کمتر از 35mN/m کاهش می‌دهند (۲۹). سان (Sun) و همکارانش در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که سورفکتانت‌ها به علت داشتن بخش‌های آب‌دوست و آب‌گریز از طریق کاهش کشش سطحی، میزان حلالیت ترکیبات آلی مانند PAHs را افزایش می‌دهند. آن‌ها نشان دادند که با افزایش تولید بیوسورفکتانت، کشش سطحی کاهش می‌یابد (۳۰). همچنین قرائی (Gharaei) و همکارانش در سال ۲۰۲۲، کمترین میزان کشش سطحی (43mN/m) را همزمان با بیشترین میزان رشد سلولی ($\text{OD}_{600}=2$) مشاهده کردند. پژوهش آن‌ها نشان داد که میان رشد سلولی، تولید بیوسورفکتانت و کاهش کشش سطحی ارتباط وجود دارد و تولید بیوسورفکتانت به رشد سلولی وابسته بوده و باعث کاهش کشش سطحی می‌شود (۳۱).

نتایج نشان داد که در غلظت ثابت 100ppm از هر PAHs مورد مطالعه، جذب نوری به عنوان شاخص رشد سلولی با افزایش تعداد حلقه‌های بنزن و وزن مولکولی PAHs، کاهش می‌یابد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است میزان رشد سلولی در حضور نفتالن بیشتر از فنانترون و در حضور فنانترون بیشتر از پاپیرن است. مطالعات زانگ (Zang) و همکارانش نشان داد که با افزایش وزن مولکولی PAHs، میزان دسترسی زیستی آن برای میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد و این مسئله باعث کاهش رشد سلولی باکتری می‌شود و این نتایج با مطالعات گذشته که ثابت کردند میزان تجزیه زیستی PAHs با ساختار شیمیایی و ساختار مولکولی آن‌ها مرتبط بوده و تعداد حلقه‌های آروماتیک و

شناسایی کند. در ادامه، توانایی سویه منتخب در تجزیه زیستی سه نوع PAHs مختلف مطالعه، و تاثیر وزن مولکولی و غلظت اولیه PAHs بر روی توانایی تجزیه سویه منتخب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که سویه بومی جدا شده، توانایی تجزیه زیستی انواع PAHs با غلظت‌های مختلف را داشته و می‌توان از آن به عنوان سویه‌ای مناسب در حذف آلودگی PAHs مرتبط با ترکیبات نفتی استفاده کرد. همچنین نوع PAHs و غلظت اولیه آن بر میزان توانایی سویه باکتریایی در تجزیه زیستی موثر است. این مطالعه اولین گزارش درباره توانایی باکتری *لبدلا گواکجینسیس* در حذف PAHs می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که به علت اینکه سویه باکتریایی KDI، از خاک شور آلوده به نفت جداسازی شده است، به‌عنوان یک سویه بومی توانایی تجزیه PAHs را دارد. الفرج (Al Farraj) و همکارانش در سال ۲۰۱۹، نشان دادند که میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست، سازگاری بیشتری با مناطق دارای غلظت بالای نمک داشته و از میان سه سویه باکتریایی مورد مطالعه‌شان، گونه کریپتوکوکوس (*Cryptococcus sp.*)، به دلیل اینکه از خاک مناطق آلوده به نفت جدا شده است، توانایی تجزیه زیستی غلظت‌های بالاتری از PAHs را نسبت به سایر سویه‌های باکتریایی داشت، این نتایج هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش است (۲۷).

بیوسورفکتانت‌ها فاکتوری مهم در حذف آلاینده‌های هیدروکربنی هستند. به همین دلیل به‌منظور انتخاب سویه باکتریایی مناسب، کشش سطحی و شاخص امولسیفیکاسیون به‌عنوان فاکتورهای تایید کننده تولید بیوسورفکتانت، مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری همزمان رشد سلولی و کشش سطحی نشان داد که میان کاهش کشش سطحی و رشد سلولی ارتباط وجود دارد، به‌طوری‌که با افزایش تراکم سلولی، کشش سطحی کاهش یافت. کشش سطحی کشت فاقد سلول مرتبط با سویه KDI، از $65/54\text{mN/m}$ به $26/60\text{mN/m}$ کاهش یافت و به مدت ۱۲۰ ساعت پایدار ماند، با این حال

زمان بیشتری برای تجزیه کامل غلظت‌های بالا PAHs نیاز دارد و توانایی تجزیه آن در مدت زمان ثابت در مقایسه با غلظت‌های پایین تر PAHs، کاهش می‌یابد. باکوسا (Bacosa) و همکارانش در سال ۲۰۲۱، میزان تجزیه PAHs با غلظت‌های اولیه متفاوت را مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که میزان تجزیه زیستی این ترکیبات در غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ ppm به ترتیب برابر با ۸۷، ۸۴، ۴۰ و ۳۰ درصد است که با افزایش غلظت اولیه PAHs، میزان تجزیه زیستی کاهش می‌یابد (۳۶). در پژوهشی دیگر ربانی (Rabani) و همکارانش تجزیه زیستی دو غلظت متفاوت از نفتالن را در حضور باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*) بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که میزان تجزیه زیستی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نفتالن به ترتیب برابر با ۷۳ و ۴۸ درصد است که نشان می‌دهد با افزایش غلظت اولیه نفتالن، میزان تجزیه زیستی کاهش می‌یابد (۳۷). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که در حضور غلظت‌های بالا از PAHs، به دلیل ایجاد شرایط سمی از رشد میکروارگانیسم‌ها ممانعت کرده و به دنبال آن میزان تجزیه زیستی کاهش می‌یابد (۳۸).

میزان رشد سلولی با افزایش غلظت PAHs کاهش یافت که این امر نشان دهنده عدم تحمل این سویه باکتریایی در غلظت‌های بالای PAHs بوده و این روند می‌تواند بر میزان تجزیه زیستی تاثیر بگذارد، این نتیجه همسو با نتایج تحقیقات گذشته است (۳۹).

همچنین نتایج نشان داد اگرچه روند تجزیه زیستی توسط باکتری‌ها به صورت صعودی است اما با گذشت زمان به علت کهنه شدن کشت سلولی و کاهش رشد باکتریایی میزان سرعت تجزیه زیستی PAHs نسبت به روزهای ابتدایی کاهش می‌یابد که این یافته‌ها با نتایج به دست آمده توسط زو (Xu) و همکارانش در سال ۲۰۲۲ مطابقت دارد (۴۰). ونگ (Wang) و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۱، نشان دادند که با گذشت زمان به علت اثر سمی تجمع متابولیت‌های حاصل از تجزیه PAHs بر روی رشد سلولی سویه باکتریایی، میزان تجزیه زیستی کاهش می‌یابد (۴۱).

اتم‌های کربن، بر روی پایداری و آب‌گریز بودن و تجزیه زیستی PAHs موثر است، مطابقت دارد (۳۲). در مطالعه‌ای دیگر، گوآرتانان (Govarthanan) و همکاران در سال ۲۰۲۰، تاثیر غلظت ثابتی از ۴ نوع مختلف PAHs با وزن مولکولی متفاوت را مطالعه کردند و نشان دادند که سویه هالوموناس RM (*Halomonas sp. RM*) توانایی رشد بر روی هر ۴ نوع PAHs (نفتالن، فناترن، پایرن و بنزوآلفا پایرن)، را دارد اما با افزایش وزن مولکولی آن‌ها، میزان رشد سلولی (جذب نوری) و به دنبال آن بازدهی تجزیه زیستی کاهش می‌یابد (۳۳). در مطالعه‌ای دیگر، سیوارام (Sivaram) و همکارانش نشان دادند که با افزایش وزن مولکولی PAHs، میزان حلالیت آن کاهش یافته و به دنبال آن دسترسی سویه باکتریایی به آن کمتر می‌شود که در نتیجه آن، میزان تجزیه آن توسط سویه باکتریایی کاهش می‌یابد (۳۴).

مطابق شکل‌های ۴، ۵ و ۶، روند رشد سلولی در حضور PAHs مختلف، ابتدا به صورت صعودی بوده اما با گذشت زمان به علت محدود شدن منابع غذایی، رشد باکتریایی وارد مرحله سکون شده و سپس روند کاهشی دارد. ساکشی (Sakshi) و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که رشد سلولی باکتری در شش روز ابتدایی انکوباسیون به تدریج افزایش یافته و بیشترین میزان تجزیه فناترن نیز در روزهای ابتدایی رخ داده اما با گذشت زمان، همزمان با کاهش رشد سلولی، میزان تجزیه زیستی نیز کاهش یافته بود (۳۵). همچنین مطابق این نمودارها، می‌توان دریافت در غلظت‌های بالاتر PAHs (۸۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) به علت بالاتر بودن میزان منابع کربن، در مدت زمان ثابت نسبت به غلظت‌های پایین‌تر، روند کاهشی با سرعت کم اتفاق می‌افتد. نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نفتالن، فناترن و پایرن بر روی میزان رشد سلولی و تجزیه زیستی آن‌ها نشان داد که، غلظت اولیه PAHs نه تنها بر میزان تجزیه زیستی آن توسط سویه باکتریایی KDI، بلکه بر میزان رشد سلولی هم تاثیر می‌گذارد. به طوری که با افزایش غلظت اولیه PAHs، منابع کربن بیشتری برای تبدیل به انرژی در دسترس سلول باکتری است و در نتیجه باکتری مدت

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که میزان تجزیه زیستی PAHs مختلف توسط سویه باکتریایی تحمل‌کننده نمک KDI، می‌تواند تحت تاثیر غلظت اولیه PAHs و وزن مولکولی آن قرار بگیرد. با این حال سویه باکتریایی KDI، به‌عنوان یک سویه باکتریایی تحمل‌کننده نمک، توانایی تجزیه غلظت‌های مختلف PAHs متفاوت (دارای وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد) را در حضور نمک، به‌عنوان یک عامل محدودکننده تجزیه زیستی PAHs، دارد. این سویه باکتریایی با تولید بیوسورفکتانت‌های لازم، دسترسی و حلالیت PAHs را افزایش داده و منجر به تجزیه آن‌ها می‌شود. بنابراین استفاده از این سویه باکتریایی به‌عنوان عامل زیست‌پالایی، به‌منظور حذف آلاینده‌های PAHs مرتبط با خاک‌های آلوده به نفت می‌تواند موثر باشد. استفاده از این سویه باکتریایی در حذف ترکیبی از PAHs مختلف، در مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران برای ارائه تجهیزات لازم در انجام این پژوهش سپاسگزارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Dai C, Han Y, Duan Y, Lai X, Fu R, Liu S, Leong KH, Tu Y, Zhou L. Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments. *Environ Res.* 2022; 205:112423. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112423>
2. Xingjian Xu, Wenming Liu, Wei Wang, Shuhua Tian, Pan Jiang, Qige Qi, Fengjiao Li, Haiyan Li, Quanying Wang, Huai Li, Hongwen Yu. Potential biodegradation of phenanthrene by isolated halotolerant bacterial strains from petroleum oil polluted soil in Yellow River Delta. *Sci. Total Environ.* 2019; 664:1030-1038. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.080>
3. Mallah M. A, Changxing L, Mallah M. A, Noreen S, Liu Y, Saeed M, Xi H, Ahmed B, Feng F, Mirjat A. A, Wang W, Jabar A, Naveed M, Li J. H, Zhang Q. Polycyclic aromatic hydrocarbon, and its effects on human health: An overview. *Chemosphere.* 2022; 296:133948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133948>
4. Gupte A, Tripathi A, Patel H, Rudakiya D, Gupte S. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs): A perspective. *Open Biotechnol J.* 2016; 10:363-368.
5. Imam A, Kumar Suman S, Kanaujia PK, Ray A. Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. *Bioresour Technol.* 2022; 343:126121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126121>.

6. Kuppusamy S, Thavamani P, Megharaj M, Naidu R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings Assessments in liquid- and slurry-phase systems. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2016; 108:149-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.013>
7. Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, Verachtert H, Diels L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66:1834-1843
8. Subashchandrabose S. R, Venkateswarlu K, Naidu R, Megharaj M. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP. *Sci Total Environ.* 2019; 651(1): 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.192>
9. Akbari A, David C, Rahim A A, Ghoshal S. Salt selected for hydrocarbon-degrading bacteria and enhanced hydrocarbon biodegradation in slurry bioreactors. *Water Res.* 2021; 202:117424. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117424>
10. Al Farraj D. A, Hadibarata T, Yuniarto A, Alkufeidy R. M, Alshammari M. K, Syafiuddin A. Exploring the potential of halotolerant bacteria for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Bioprocess and biosystems engineering.* 2020; 43(12):2305–2314. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02415-4>
11. Pourbabaee A.A, Shahriari M.H, Garousin H. Biodegradation of phenanthrene as a model hydrocarbon: Power display of a super-hydrophobic halotolerant enriched culture derived from a saline-sodic soil. *Biotechnol Rep.* 2019; 24: e00388. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00388>
12. Ghorbannezhad H, Moghimi H, Dastgheib SMM. Biodegradation of high molecular weight hydrocarbons under saline condition by halotolerant *Bacillus subtilis* and its mixed cultures with *Pseudomonas* species. *Sci Rep.* 2022; 2;12(1):13227. doi: 10.1038/s41598-022-17001-9
13. Rahimi E. S, Fooladi J, ebrahimipour G, Soudi M. R, Fooladi T. Isolation of fluorene degrading microorganisms from sediments of the Southern Caspian Sea Coasts and evaluation of their bioremediation potential. *Journal of Microbial World.* 2020; 13(13): 239-252 [In Persian]
14. Orgiazzi A, Ballabio C, Panagos P, Jones A, Fernández-Ugalde O. LUCAS Soil, the largest expandable soil dataset for Europe: A review. *Eur J Soil Sci.* 2018; 69: 140–153. <https://doi.org/10.1111/ejss.12499>
15. Jorfi S, Mohamadiyan G, Jaafarzadeh N, Esrafil A, Akbari H, Ali G. Bioremediation of Pyrene-Contaminated Soils Using Biosurfactant. *Jentashapir Journal of Health Research.* 2014; 5(5): e23228. <https://doi.org/10.17795/jjhr-23228>.
16. Dastgheib S.M, Amoozegar M.A, Khajeh K, Shavandi M, Ventosa A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 95(3):789–798. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3706-4>

17. Lin M, Hu X, Chen W, Wang H, Wang C. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2014; 94: 176–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.011>
18. Liu X. X, Hu X, Cao Y, Pang W. J, Huang J. Y, Guo P, Huang L. Biodegradation of Phenanthrene and Heavy Metal Removal by Acid-Tolerant *Burkholderia fungorum* FM-2. *Front Microbiol*. 2019; 10: 408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00408>
19. Akhavan Sepahi.A, Dejban golpasha, Emami.M, Nakhoda.A.M. Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus* spp. *Iran.J.Environ.Health.Sci.Eng*. 2008; 5:149-154.
20. Nogueira Felix AK, Martins J JL, Lima Almeida JG, Giro MEA, Cavalcante KF, Maciel Melo VM, Loiola Pessoa OD, Ponte Rocha MV, Rocha Barros Gonçalves L, Saraiva de Santiago Aguiar R. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids Surf B*. 2019; 175:256-263. <https://doi:10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>
21. Reddy MS, Naresh B, Leela T, Prashanthi M, Madhusudhan N.Ch, Dhanasri G, Prathibha Devi. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresour Technol*. 2010; 101(20):7980-7983. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.054>
22. Lee BB, Chan ES, Ravindra P, Khan TA. Surface tension of viscous biopolymer solutions measured using the du Nouy ring method and the drop weight methods. *Polym. Bull*. 69: 471-489. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0782-2>
23. Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21:61–68
24. Feng L, Chen Y, Ren J, Qu X. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. *Biomaterials*. 2011; 32:2930–2937
25. Firoozbakht M, Sepahi AA, Rashedi H, Yazdian F. Investigating the effect of nanoparticle on phenanthrene biodegradation by *Labeledella gwakjiensis* strain KDI. *Biodegradation*. 2022; 33 (5):441-460. <https://doi.org/10.1007/s10532-022-09991-0>
26. Caglar G B, Eker S G. Prediction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Removal from Wastewater Treatment Sludge Using Machine Learning Methods. *Water Air Soil Pollut*. 2021; 232: 87. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05049-8>
27. Al Farraj DA, Elshikh MS, Al Khulaifi MM, Hadibarata T, Yuniarto A, Syafiuddin A. Biotransformation, and detoxification of antraquinone dye green 3 using halophilic *Hortaea* sp. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2019; 140:72–77
28. Sarubbo L, Silva M, Durval I, Bezerra K, Ribeiro B, Silva I, Twigg M, Banat I, Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives, *Biochem. Eng. J*. 2022; 181 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377.37>.

29. Aghaei S. S, Fakharian, Zolfaghary M. R, Soleimani M. Production and characterization of biosurfactant by indigenous halotolerant *Microbacterium* sp., isolated from Qom saline soils lake. *Journal of Microbial World*, 2020; 12(4): 423-438
30. Sun S, Wang Y, Zang T, Wei J, Wu H, Wei C, Qiu G, Li F. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 2019; 281: 421–428.
31. Gharaei S, Ohadi M, Hassanshahian M, Porsheikhali S, Forootanfar H. Isolation, Optimization, and Structural Characterization of Glycolipid Biosurfactant Produced by Marine Isolate *Shewanella* algae B12 and Evaluation of Its Antimicrobial and Anti-biofilm Activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 2022;194(4):1755-1774. doi: 10.1007/s12010-021-03782-8.
32. Zang T, Wu H, Yan B, Zhang Y, Wei C. Enhancement of PAHs biodegradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs. *Chemosphere.* 2021; 266:128941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128941>
33. Govarthanan M, Khalifa AY, Kamala-Kannan S, Srinivasan P, Selvankumar T, Selvam K, Kim W. Significance of allochthonous brackish water *Halomonas* sp. on biodegradation of low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere.* 2020; 243:125389.
34. Sivaram AK, Logeshwaran P, Lockington R, Naidu R, Megharaj M. Low molecular weight organic acids enhance the high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by bacteria. *Chemosphere.* 2019; 222:132-140.
35. Sakshi, Singh SK, Haritash AK. Catabolic enzyme activities during biodegradation of three-ring PAHs by novel DTU-1Y and DTU-7P strains isolated from petroleum-contaminated soil. *Arch Microbiol.* 2021;203(6):3101-3110. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02297-4>
36. Bacosa H. P, Kang A, Lu K, Liu Z. Initial oil concentration affects hydrocarbon biodegradation rates and bacterial community composition in seawater. *Marine pollution bulletin.* 2021; 162, 111867. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111867>
37. Rabani MS, Sharma R, Singh R, Gupta M.K. Characterization and Identification of Naphthalene Degrading Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites and Their Possible Use in Bioremediation, Polycyclic Aromatic Compounds. 2022; 42:3,978-989, <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1759663>
38. Kong X, Dong R, King T, Chen F, Li H. Biodegradation Potential of *Bacillus* sp. PAH-2 on PAHs for Oil-Contaminated Seawater. *Molecules.* 2022; 27(3):687. <https://doi.org/10.3390/molecules27030687>
39. Zhong Y, Luan T, Wang X, Lan C, Tam N.F. Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. strain PheB4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 75, 175e186. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0789-4>.

40. Xu M, Wu M, Zhang Y, Zhang H, Liu W, Chen G, Xiong G, Guo L. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial mixture. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2022; 19: 3833–3844 <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03284-4>
41. Wang Y, Nie M, Diwu Z, Chang F, Nie H, Zhang B, Bai X, Yin Q. Toxicity evaluation of the metabolites derived from the degradation of phenanthrene by one of a soil ubiquitous PAHs-degrading strain *Rhodococcus qingshengii* FF. *J. Hazard. Mater.* 2021; 415: 125657. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125657>