مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۵۵-۱۴۵

Original Article

جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی از مخازن نفتی آسماری اهواز

راحیل کیانپور برجوئی*[۱]، حسین معتمدی[۲]، زهرا بم زاده[۳]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، [۲]استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، [۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد.

چکیده

سابقه و هدف: زیست پالایی فناوری حذف آلودگی های نفتی می باشد. از میان تمامی روش های حذف آلودگی، زیست پالایی به کمک فرآیند های میکروبی با کمترین مقدار انرژی، ماده شیمیایی و زمان قادر به تبدیل آلاینده ها به مواد غیر سمی می باشند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی از مخازن نفتی آسماری اهواز انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت میدانی در مخازن نفتی آسمار اهواز انجام شد. با استفاده از محیط پایه نمکی، به وسیله غنی سازی چند مرحله ای جدایه ها جداسازی و میزان تحمل نمک آن ها بررسی شد. در نهایت با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی، میزان تجزیه وحذف ترکیبات هیدروکربنی توسط باکتری جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت. سپس سویه مورد نظر بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و توالی یابی ژن *16S rRNA* در حد جنس شناسایی گردید.

یافته ها: در این مطالعه یک سویه باکتریایی گرم مثبت هالوتولرانت از جنس *استرپتومایسس* جداسازی شد. این جدایه رشد قابل قبولی را در غلظت ۷/۵ درصد نمک نشان داد و قادر به استفاده از نفت به عنوان تنها منبع کربن بود. همچنین این جدایه قادر به کاهش ۷۱/۵۸ درصد هیدروکربن های موجود در محیط پایه نمکی در مدت ۱۰ روز بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می توان بیان کرد این جدایه قادر به تحمل غلظت بالای نمک و حذف مطلوب ترکیبات هیدروکربنی می باشد. این امر به دلیل تفاوت غلظت نمک مناطق آلوده یک مزیت محسوب می شود. بنابراین با این جدایه می توان ورود آلاینده ها به محیط زیست و عوارض حاصل از آن را کاهش داد.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، باکتری تجزیه کننده نفت خام، آلاینده های هیدروکربنی.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۴

مقدمه

آلودگی نفتی از مهم ترین آلودگی های زیست محیطی می باشد. زیست پالایی (Bioremediation)، روشی مؤثر و کاربردی در پاکسازی آلودگی های محیطی می باشد. رشد روز افزون فعالیت های صنعتی و عدم رعایت قوانین زیست محیطی سبب شده است تا در دهه های اخیر مقادیر زیادی از آلاینده های هیدروکربنی به واسطه عواملی مانند پخش آلاینده توسط فعالیت های انجام شده در زمینه اکتشاف، استخراج، حمل و نقل و بهره برداری پالایشگاه ها، نشت آلاینده از مخازن نفتی زیر زمینی و ایستگاه های سوخت گیری، تانکر ها، نفتکش ها و غیره وارد محیط زیست شود. بخشی از این آلاینده ها توسط میکروارگانیسم های موجود در آب و خاک و یا تحت تاثیر عوامل فیزیکی و زیستی تجزیه و حذف می گردند.

اما بخش عمده آن ها در محیط زیست تجمع یافته و تهدیدی جدی برای سلامت انسان و موجودات زنده به شمار می رود (۱ و ۲). آلودگی های حاصل از ترکیبات نفتی در صورتی که

* آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۳۵۹۱۳۸۱۸۷ پست الکترونیک: kiyanpourr@gmail.com

کم باشد می تواند به تدریج در طبیعت تحت تاثیر عواملی مانند تبخیر شدن و فتو اکسیداسیون نوری به ترکیبات دیگری تبدیل و یا توسط میکروارگانیسم های موجود در محیط مصرف و حذف می گردند (۳ و ٤). اما در آلودگی های گسترده محیطی، آسیب وارد شده به طور خودبخودی برطرف نمی شود. بنابراین تخریب زیست محیطی از جانب این آلودگی های نفتی، نیاز به راهکارهای اساسی سازگار با محیط زیست را برای برطرف کردن آن ها مطرح کرده است. تا بتوان با کمترین هزینه و بدون اینکه دخل و تصرفی در اکوسیستم ایجاد شود آلاینده ها را برطرف نمود.

تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم ها، به دلیل امتیازات خاص و نیز سازگاری این روش با طبیعت، بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و نقشی اساسی را به خصوص در حذف اجزای غیر فرار نفت از محیط زیست ایفا می کند (۷-۵). باکتری های حقیقی نمک دوست مجموعه متنوعی از میکروارگانیسم ها را تشکیل می دهند که از نظر فیزیولوژی متعلق به جنس های متفاوتی هستند. باکتری های یاد شده به دو گروه نمک دوست و تحمل کننده نمک تقسیم می شوند:

۱- میکروارگانیسم هایی که بهینه رشد آن ها در محیط فاقد نمک یا غلظت های پایین تر از نمک دریا باشد، ولی تراکم های نسبتاً بالای نمک را نیز تحمل می کنند، تحمل کننده نمک نامیده می شوند.

۲- میکروارگانیسم های نمک دوست قادر به رشد در محیط فاقد نمک نیستند، در محدوده شوری متفاوتی می توانند رشد کنند و دارای بهینه رشد در محیط هایی با میزان شوری نسبتاً بالا هستند (۸).

بسیاری از فرایندهای صنعتی تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی ویژه انجام می شوند. به این دلیل، اکسترموفیل ها بسیار مهم و با ارزش هستند (۹). در این مورد استفاده از باکتری های نمک دوست تجزیه کننده نفت، فوایدِ دیگری نیز دارد. زیرا آنزیم ها و سایر عوامل تولید شده توسط این میکروارگانیسم ها، از جمله بیوسورفکتانت های تولید شده، در مناطق با شوری بالا پایدار است. از آنجایی که بیشتر مخازن نفتی در مناطق با دمای بالا و شوری فراوان واقع هستند، استفاده از این میکروارگانیسم ها یا بیوسورفکتانت های آنها در چاه های نفتی به ظاهر تخلیه شده برای استخراج ثالثیه نفت نیز بسیار کارآمد می باشد (۱۰).

پژوهش های متعدد نشان می دهد که سویه های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی های نفتی مقاوم هستند، بلکه برخی از آن ها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده نمایند. بنابراین وجود این ترکیبات نه تنها مانع رشد باکتری ها نمی شود بلکه موجب رشد بیشتر و سریع تر باکتری های سازگار می شوند (۱۱).

تا کنون تعداد زیادی از باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی شده اند. با این وجود تعداد کمی از آن ها به نظر می رسد که در تجزیه زیستی در محیط های طبیعی حائز اهمیت باشند. از مهم ترین باکتری های تجزیه کننده این مواد می توان به جنس های *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *اسینتوباکتر* (*Acinetobacter*)، *باسیلوس* (*Bacillus*)، *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*)، *مارینوباکتر* (*Marinobacter*)، *اسفینگوموناس* (*Sphingomonas*)، *بورخولدریا* (*Burkholderia*) و *ویبریو* (*Vibrio*) اشاره نمود (۷ و ۱۲). همچنین قارچ هایی مانند *فوزاریوم* (*Fusarium*)، *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*)، *کلادوسپوریوم* (*Cladosporium*) و *کاندیدا* (*Candida*) نیز قادر به مصرف هیدروکربن های نفتی می باشند (۱۳ و ١٤). رها سازی این آلودگی ها در محیط باعث به خطر افتادن سلامت موجودات و همچنین انتقال آلودگی به زنجیره غذایی انسان می گردد. از این رو حذف آلاینده های نفتی از منابع آبی هم از جنبه محیطی و هم از نظر حفظ سلامت انسانی حائز اهمیت است. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنی به منظور استفاده از آن جهت حذف آلودگی های نفتی مناطق آلوده بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: در این مطالعه میدانی به منظور جداسازی

باکتری تجزیه کننده، نمونه گیری از سه مخزن مختلف هیدروکربوری آسماری اهواز انجام گرفت. برای نمونه گیری از شیشه های درپوش دار استریل استفاده شد. نمونه ها تا زمان جداسازی باکتری در یخچال (٤ °C) نگهداری شدند و به منظور هوادهی، درپوش آن ها به صورت نیمه باز گذاشته شد.

ب) جداسازی و غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت خام: از محیط سنتزی پایه نمکی بوشنل هاس (Bushnell Hass Mineral Salt) (مرک، آلمان) برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام استفاده شد. محیط BHMS حاوی ترکیبات زیر است (گرم بر لیتر):

۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۱ گرم NH_4NO_4 و دو قطره از $FeCl_3$ ٦۰ درصد و pH محیط نیز ۷ بود. یک درصد نفت خام سبک ایران (تهیه شده از شرکت ملی نفت جمهوری اسلامی ایران) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی در محیط استفاده شد (۱۵). در ابتدا ۱ میلی لیتر از نمونه های جمع آوری شده از مخازن نفتی، همراه با آب نمک دارای شوری بالا به ارلن های دارای ۱۰۰ میلی لیتر از محیط BHMS تلقیح شد. نمونه ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ °C، بر روی شیکر با دور ۱۸۰ RPM، قرار داده شدند. پس از دو بار واکشت، کلنی باکتری ها بر روی محیط BHMS حاوی آگار، خالص سازی گردید.

ج) آزمون هالوفیلیته: به منظور بررسی توانایی رشد در درصدهای مختلف نمک و بررسی هالوفیل یا هالوتولرانت بودن جدایه باکتریایی از آزمون هالوفیلیته استفاده گردید. در ابتدا جدایه در محیط نوترینت آگار حاوی ۱ تا ۱۰ درصد کلرید سدیم، کشت داده شد. سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری گردید. پس از گذشت ٤۸ ساعت رشد باکتری ها از نظر مشاهده کلنی به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت (١٦).

د) بررسی کفایت حذف نفت خام :

۱- سترون سازی نفت خام: به منظور بررسی عملکرد باکتری تلقیح شده بر روی نفت خام ، ابتدا نمونه نفت خام مصرفی سترون گردید. از آنجایی که حرارت، موجب تبخیر یا تغییر ماهیت بخشی از مواد تشکیل دهنده نفت خام می گردد، عمل سترون سازی با استفاده از فیلتراسیون با کمک صافی های نیتروسلولزی سترون ساخت Jet-Biofilکانادا با قطر منافذ ۰/٤۵ میکرون صورت گرفت (۱۷).

۲- تهیه محیط کشت بوشنل هاس حاوی نفت خام و باکتری: ابتدا باکتری شناسایی شده در ۱۰ میلی لیتر محیط آبگوشت مغذی، کشت داده شد و در دمای ۲۸ °C گرماگذاری گردید. پس از رسیدن به کدورتی معادل ۰/۷ نیمه مک فارلند یک میلی لیتر از آن در ۱۰۰ میلی لیتر از محیط پایه معدنی حاوی ۲ میلی لیتر نفت خام اضافه گردید. از نمونه فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد (۱۸). سپس نمونه ها به مدت ۱۰ روز در گرمخانه ۲۸ °C مجهز به شیکر گرماگذاری شدند.

۳- بررسی راندمان حذف نفت خام: در آزمون تجزیه زیستی نفت خام، برای اندازه گیری مقدار هیدروکربن های باقی مانده در نمونه ها پس از گذشت ۱۰ روز تماس باکتری با نفت خام، هیدروکربن های باقی مانده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از حلال سیکلوهگزان محلول مورد نیاز برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی تهیه گردید (۱۹).

از آنجایی که کاهش بخشی از نفت خام به دلیل فراریت از نمونه ها می باشد، مقایسه غلظت نفت خام با نمونه شاهد فاقد باکتری صورت گرفت. سپس هیدروکربن های باقی مانده با هیدروکربن های اولیه مقایسه و به صورت درصد حذف نفت خام محاسبه گردید (۱۱). این دستگاه مدل وریان CP3800 با آشکار ساز یونیزاسیون شعله ای (Flame Ionization Detector) و ستون مویینه میکروپور (Capillary) به طول ۳۰ متر بود.

ه) شناسایی باکتری های تجزیه کننده: ویژگی های مورفولوژیکی و فیزیولوژی در نوترینت آگار مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از رنگ آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی و آزمون های بیوشیمیایی مانند حرکت، اکسیداز، کاتالاز، متیل رد، وژس پروسکائر و تولید اندول شناسایی اولیه

باکتری های تجزیه کننده صورت گرفت (۲۰ و ۲۱). در این مطالعه به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA ساخت شرکت فرمنتاز-لیتوانی استفاده شد. به منظور شناسایی مولکولی باکتری جداسازی شده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و پرایمرهای ژن *16S rRNA* شامل Fd1: CGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG و RP1: CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT استفاده شد (۲۲).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase و ۱۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Eppendorf, Germany) با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٥٦ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۲۳). محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. سپس باند ۱۵۰۰ جفت بازی از ژل آگاروز مطابق با دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. هومولوژی توالی های به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی آنلاین با استفاده از نرم افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت (http://www.ncbi.nih.gov/blast) و جدایه در حد جنس شناسایی گردید (۲٤).

یافته ها

با استفاده از محیط سنتزی پایه نمکی بوشنل هاس حاوی ۱ درصد نفت خام استریل و غنی سازی چند مرحله ای یک باکتری گرم مثبت هالوتولرانت نفت خوار جداسازی شد.

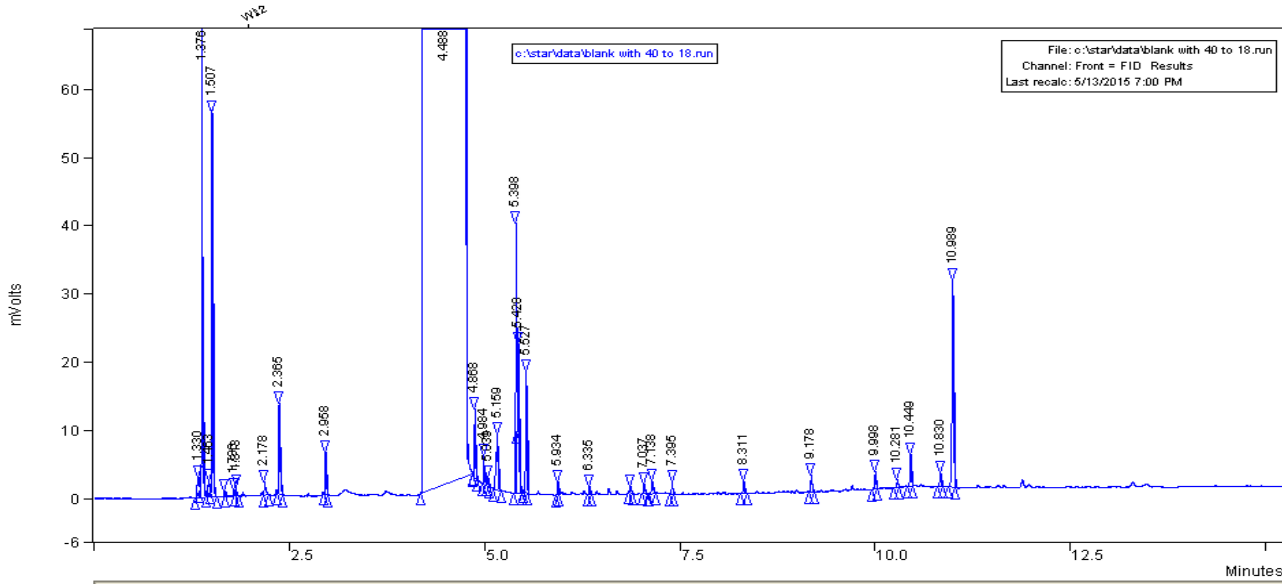
الف) آزمون هالوفیلیته: نتایج آزمایش نشان داد که باکتری MR_1 در محیط نوترینت آگار حاوی غلظت های مختلف نمک (۱ تا ۱۰ درصد نمک) تا ۷/۵ درصد نمک توانایی رشد داشته است. شایان یادآوری است که در غلظت های پایین تر رشد بیشتری مشاهده گردید و با افزایش غلظت رشد کاهش یافت. بنابراین جدایه MR_1 غلظت های بالای نمک را تحمل می کند. با این وجود رشد بهینه آن در غلظت های پایین تر می باشد. این امر تایید کننده هالوتولرانت بودن این جدایه بود (جدول ۱).

ب) ارزیابی راندمان حذف نفت خام: پس از جداسازی جدایه MR_1 درصد حذف ترکیبات هیدروکربنی نفت برای این جدایه با روش گازکروماتوگرافی اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده از گاز کروماتوگرافی این جدایه نسبت به شاهد نشان داد که این جدایه قادر به حذف ۷۱/۵۸ درصد از ترکیبات هیدروکربنی به مدت ۱۰ روز می باشد. در شکل های ۱ و ۲ کروماتوگرام های حاصل از گاز کروماتوگرافی جدایه MR_1 و نمونه شاهد نشان داده شده است.

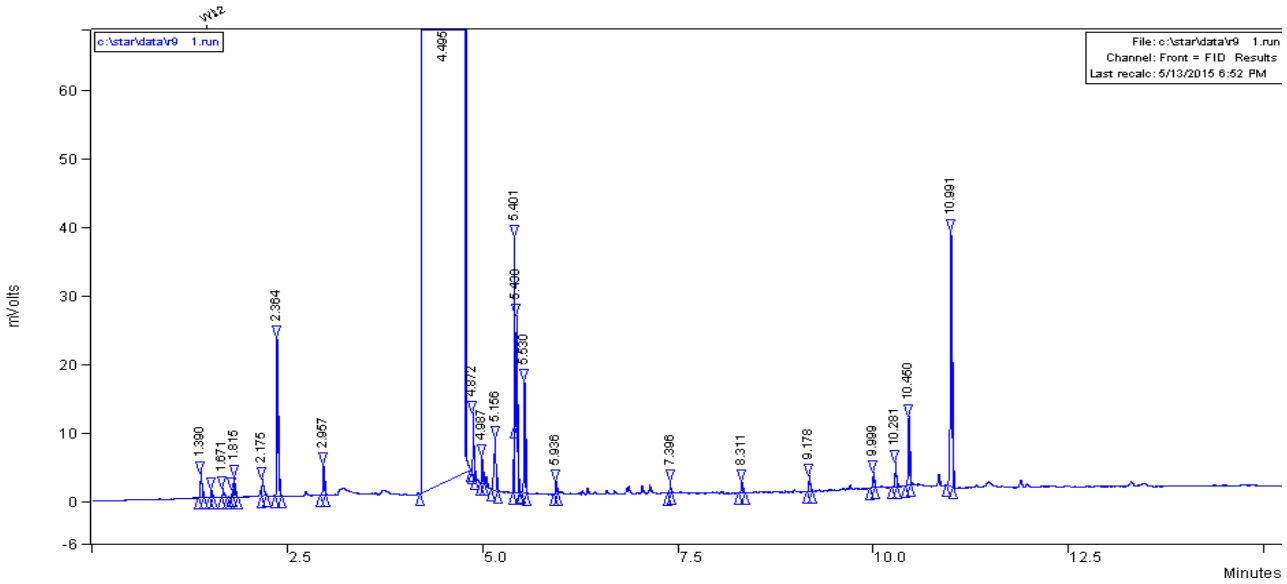
ج) شناسایی باکتری: خصوصیات ریخت شناسی و آزمون های بیوشیمیایی باکتری شباهت آن را با جنس *استرپتومایسس* (*Streptomyces* sp.) نشان داد (شکل ۳). کلنی های ایجاد شده بر روی پلیت نوترینت آگار زرد سفید با حاشیه صاف و محدب بودند. نتایج آزمون های بیوشیمیایی در جدول ۲ آورده شده است. آنالیز فیلوژنی قطعه *16S rRNA* نیز قرابت ۹۵ درصد شباهت با جنس *استرپتومایسس* (Accession GU263860.1) را تایید نمود. شکل ٤ درخت فیلوژنتیکی خویشاوندی جدایه

جدول ۱: نتایج آزمون هالوتولرانت در مورد جدایه MR1 در محیط نوترینت آگار حاوی غلظت های مختلف نمک در دمای ۲۸ °C.

آزمون	نتیجه
رشد در نمک ۱ درصد	مثبت
رشد در نمک ۲/۵ درصد	مثبت
رشد در نمک ۵ درصد	مثبت
رشد در نمک ۷/۵ درصد	مثبت
رشد در نمک ۱۰ درصد	منفی



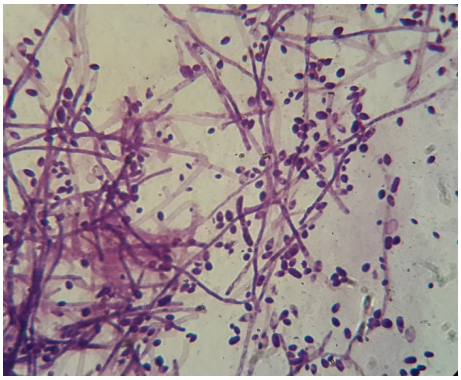
شکل ۱: کروماتوگرافی گازی نمونه شاهد.



شکل ۲: کروماتوگرافی گازی نمونه MR_1.

جدول ۲: مشخصات بیوشیمیایی و مورفولوژیک جدایه MR_1.

آزمون	نتیجه	آزمون	نتیجه
موفولوژی کلنی بر روی محیط کشت نوترینت آگار	کلنی پودری زرد سفید	اسنات	منفی
شکل میکروسکوپی	کوکسی	تحرک و ایندول	منفی
رنگ آمیزی گرم	مثبت	سولفید	منفی
کاتالاز	مثبت	MR	مثبت
اکسیداز	منفی	VP	منفی
سیترات	منفی	TSI	آلکالن/آلکالن



شکل ۳: تصویر رنگ آمیزی گرم جدایه MR_1 به وسیله میکروسکوپ نوری.

MR_1 با برخی از گونه های جنس *استرپتومایسس* را نشان می هد.

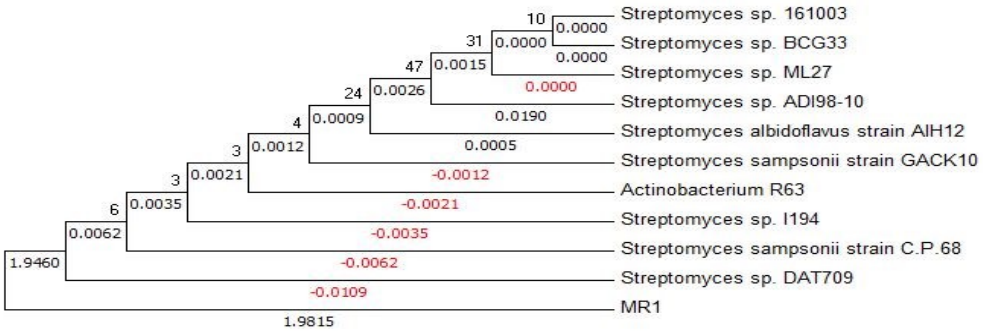
بحث

نشت نفت و محصولات نفت خام در طی مراحل بهره برداری در محیط های دریایی و خاکی اثرات زیانباری را به دنبال دارد. از این رو سازمان حفاظت از محیط زیست جهانی و سازمان های غیر دولتی حامی محیط زیست در اکثر کشورهای صنعتی تلاش های زیادی در جهت یافتن راه حل هایی برای این معضل هستند (۲۵ و ۲۶). تحقیقات نشان داده است که آلودگی های نفتی در طبیعت به تدریج با فرآیندهای مختلف به ترکیبات تجزیه پذیر تبدیل شده و به آهستگی توسط میکروارگانیسم های موجود در محیط حذف می شوند (۲۷ و ۲۸). میکروارگانیسم هایی که در نواحی آلوده به مواد نفتی یافت می شوند اغلب توانایی تجزیه و مصرف این ترکیبات را به عنوان منبع کربن و انرژی دارند.

این میکروارگانیسم ها تحت شرایط سخت در محیط رشد می کنند. به همین دلیل کارایی آنها در شرایط طبیعی پایین می باشد. با این وجود اگر شرایط محیطی مناسب برای آن ها مهیا شود می توانند با سرعت قابل ملاحظه ای آلاینده های نفتی را تجزیه و به عنوان منبع کربن مصرف نمایند (۲۹). تحقیقات متعددی بر روی میکروارگانیسم های تجزیه کننده نفت به منظور یافتن بهترین سویه های تجزیه کننده این آلاینده ها در مناطق مختلف صورت گرفته است. سولاناس (Solanas) و همکاران با مطالعه بر روی جمعیت های باکتریایی تجزیه کننده نفت دریافتند که ارتباط بسیار نزدیکی بین ترکیبات محیط کشت و توان تجزیه زیستی میکروارگانیسم ها وجود دارد (۳۰). در همین راستا این باکتری در محیط کشت معدنی، از نظر توان تجزیه زیستی نفت خام مورد آزمایش قرار گرفت. روزلین (Rozlyn) و همکاران در تحقیقات خود عنوان کردند که سویه RM6 برای تجزیه دی بنزوتیوفن نیاز به ویتامین B12 دارد که به صورت مکمل باید به محیط کشت اضافه گردد (۳۱).

در مطالعه حاضر سویه MR_1 برای تجزیه نفت خام احتیاجات غذایی ساده تری دارد. به طوری که این نیازها صرفاً توسط نمک های معدنی محیط کشت پایه نمکی معدنی تامین گردید. مهنا (Mohana) و همکاران گزارش کردند که *سودوموناس آئروجینوسا* سویه PAO1 در محیط حاوی نمک های معدنی، مشابه محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش، قادر به تجزیه هیدروکربور های نفتی است. با این وجود، علاوه بر نمک های معدنی می بایست در حدود ۰/۵ گرم گلوکز نیز به محیط کشت *سودوموناس آئروژینوسا* اضافه می شد (۳۲).

اما در مورد سویه MR_1 جداسازی شده در این پژوهش نیازی به افزودن گلوکز نیست. زیرا این باکتری نفت خام را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی به کار می برد. در مطالعه حاضر اثر غلظت های مختلف سدیم کلراید (W/V ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) بر روی رشد جدایه باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این جدایه توانایی تحمل نمک تا غلظت ۷/۵ درصد را دارا می باشد. کوئین (Qin) و همکاران با بررسی اثر نمک بر رشد و تجزیه ترکیبات نفتی در جمعیتی از باکتری های



شکل ۴: درخت فیلوژنتیکی خویشاوندی جدایه MR_1 با برخی از گونه های جنس *استرپتومایسس*.

نفت خوار، دریافتند که با افزایش غلظت نمک محیط فعالیت باکتری کاهش می یابد. آن ها با استفاده از سویه های مقاوم به نمک در یک دوره ۲۸ روزه توانستند بیشترین مقدار حذف زیستی نفت را به ٤٢/٣٦ درصد برسانند (۳۳). نتایج به دست آمده در این مطالعه با تحقیقات کوئین هم خوانی دارد. با این تفاوت که سویه MR_1 در غلظت های بالای نمک در مدت زمان کمتری توانایی حذف ۱ درصد نفت به میزان ۷۱/۵۸ درصد را داشته است. در مطالعه دیگری ویور (Wever) و همکاران گزارش نمودند که باکتری *رودوکوکوس رودوکوروس* (*Rhodococcus rhodocorous*) قادر به تجزیه هیدروکسی بنزوتیازول می باشد. این باکتری تنها در محدوده نمکی ۱ تا ۳ درصد قادر به رشد و تکثیر بود. حال آنکه باکتری MR_1 در محدوده وسیع تر و غلظت بالاتری از نمک قادر به رشد و تجزیه ترکیبات نفتی می باشد. اورن (Oren) و همکاران گزارش کردند که باکتری *هالوباکتریوم پاریولنس* (*Halobacterium parevalens*) بیشترین میزان تجزیه ترکیبات آروماتیک نیتروژن دار را در شوری ۱۳ تا ١٤ درصد می تواند انجام دهد. آموزگار (Amozegar) و همکاران مشاهده کردند که *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) می تواند تا غلظت ۱۲ درصد بنزن را تجزیه کند (٣٤). ریو (Ryo) و همکاران سویه YHLT-2 باکتری *رودوکوکوس* را از خاک های آلوده به نفت جداسازی نمودند. این جدایه توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را در شوری حداکثر ۷ درصد دارا بود (۳۵). با توجه به این گزارشات مزیت باکتری MR_1 در تجزیه نفت خام در شوری بالا محرز می شود. شایان یادآوری است که باکتری MR_1 جدا شده در این تحقیق، از مخزن هیدروکربنی واقع در آسماری اهواز با شوری ۱/۰۱ درصد جداسازی گردید. صفری (Safari) و همکاران در بررسی مشابهی دریافتند که سیانوباکتری *شیزوتریکس واژیناتا* (*Schizothrix vaginata* ISC108) توانایی بالایی در تجزیه زیستی نفت خام به میزان ۹۳/۹۸ درصد دارد (٣٦). اما در مورد سویه جداسازی شده در این پژوهش درصد تجزیه کمتر می باشد. حسن شاهیان (Hasanshahian) و همکاران با انجام مطالعه ای در زمینه تجزیه ترکیبات نفتی توسط ۲۵ سویه جداسازی شده دریافتند که پس از ۲۱ روز بهترین سویه انتخابی قادر به حذف ۷۵ درصد از نفت خام می باشد. این سویه شناسایی شده متعلق به جنس *سودوموناس* بود و دیگر سویه ها به ترتیب قادر به حذف ۲۰، ۵۰ و ۹۰ درصد از نفت خام بودند. با این وجود سویه MR_1 در مدت زمان کمتری توانست درصد بیشتری از ترکیبات نفتی را تجزیه نماید. امینی (Amini) و همکاران در پژوهشی مشابه میزان تجزیه آنتراسن توسط نوکاردیا *سیریاسی جورجیکا* (*Nocardia cyriacigeorgica*) را به روش گاز کروماتوگرافی اندازه گیری کردند و بیان کردند که می تواند ٣٦/٦٠ درصد از آنتراسین را پس از ۹ روز تجزیه کند. با این تفاوت که در این پژوهش جدایه MR_1 جداسازی شده پس از ۱۰ روز قادر به کاهش ۷۱/۵۸ درصد ترکیبات نفت می باشد (۳۷). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه توانایی جدایه MR_1 در تجزیه و حذف ترکیبات نفتی با تحقیقات یاد شده مشاهده می شود که این جدایه کارایی مناسبی داشته و در دامنه وسیعی از غلظت های نمک رشد می کند. همچنین در این تحقیق مشخص شد که نمونه جداسازی شده یک باکتری هالوتولرانت نفت خوار از جنس *استرپتومایسس* است.

نتیجه گیری

با توجه به توانایی باکتری بومی در تجزیه نفت خام، این باکتری می تواند در شرایط سخت گزینه مناسبی برای استفاده صنعتی در فرآیند های تجزیه زیستی آلاینده های نفتی باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد با حمایت مالی اداره پژوهش و توسعه شرکت ملی مناطق نفت خیز جنوب انجام شده است. نویسندگان این مقاله از شرکت ملی نفت خیز جنوب اهواز، واحد ایمنی، بهداشت و محیط، آقایان مهندس رضا مرادی و سعید عالیوند به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Reference

1. Narimani S, Bazigar A, Mirzaee Najafgholi H. Identification of oil degrading bacteria from Poldokhtar polluted areas and investigation of factors affecting their degradation performance. Biotechnol Agri. 2015; 2(13): 11-19. [In Persian]
2. Mirsal Ibrahim A. Soil pollution: origin, monitoring and remediation, IstEd. Germany, Springer. 2004; 1: 5-11.
3. Sathishkumar 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(1): 92-96.
4. Maki HS, Haramaya S. Photo-oxidation of biodegradable crude oil and toxicity of the photooxidized products. Chemosphere. 2005; 44: 1145- 1151.
5. Taghvaei GS, Nahri NB, Khosravi M. Photooxidation of crude petroleum maltenic fraction in natural simulated conditions and structural elucidation of photo products. Iran J Environ Health Sci Eng. 2007; 4(1): 37-42.
6. Saleha H. Microbial metabolism of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. J Chem Technol Biotechnol. 2008; 80: 723-736.
7. Shen T, Pi Y, Bao M, Xu N, Li N, Lu J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. Environ Sci Processes Impacts. 2015; 17: 2022-2033
8. Jain PK, Gupta VK, Gaur RK, Lowry M, Jaroli DP, Chauhan UK. Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. Res J Environ Toxicol. 2011; 5(6): 1-26.
9. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles. 2001; 5: 73-83.
10. Dastgheib MM, Amoozegar MA, Khajeh Kh, Ventosa A. A halotolerant *Alcanivorax sp.* strain with potential application in saline soil remediation. Appl Microbial Cell Physiol. 2011; 90(1): 305-312.
11. Cheema S, Lavania M, Lal B. Impact of petroleum hydrocarbon contamination on the indigenous soil microbial community. Ann Microbiol. 2015; 65: 359-369.
12. Mohsenzadeh F. The study of microbial removal efficiency of crude oil in contaminated soils of cold climates areas (case study: Tabriz refinery). Mol Biol Res Comm. 2014; 3(27): 406-417. [In Persian]
13. Brakstad OG, Bonaunet K. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0–5°C) and bacterial communities associated with degradation. Biodeg. 2006; 17: 71- 82.
14. Chaillan F, Fleche AL, Bury E, Phantavong Y, Grimont P, saliot A, Oudot J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Res Microbiol. 2004; 155: 587-595.
15. Okerentugba PO, Ezerony OU. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. Afr J Biotech. 2003; 2(9):

288-292.

16. 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.

17. Hajizadeh N, Sefidi Heris Y, Zununi Vahed S, Vallipour J, Hejazi MA, Golabi SM, Asadpour-Zeynali K, Hejazi MS. Biodegradation of para amino acetanilide by *Halomonas* sp. TBZ3. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(9): e18622.

18. Ferguson SH, Franzmann PD, Revill AT, Snape I, Rayner JL. The effects of nitrogen and water on mineralization of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. Cold Region Sci Technol. 2003; 37: 197-212.

19. Mittal A, Singh P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. Indian J Exp Biol. 2009; 47: 760-765.

20. Hunter RD, EKunwe SIN, Dodor DE, Hwang H M, Ekunwe L. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a] pyrene. Int J Environ Res Public Health. 2005; 2(2): 267-271.

21. Burton GA. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. Appl Environ Microbiol. 1987; 53: 185-188.

22. Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994: 607-654.

23. Weisburg WG, Barns SM, Selletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991; 173(2): 697-703.

24. Azizi niko P, Hadadi A, Shavandi M, Soleimani M, Tabib A. Isolation of bacteria long-chain alkane's parser of oil-contaminated soils. New J Cell Biotechnol Mol. 2014; 3(12): 99-105.

25. Holt SG, Kriey NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergy's manual of determinative for bacteriology, Williams and Wilkins, New York; 1998.

26. Onwurah INE, Ogugua VN, Onyike NB, Ochonogor AE, Otitoju OF. Crude oil spills in the environment, effects and some innovative cleanup biotechnologies. Int J Environ Res. 2007; 1 (4): 307-320.

27. Vennila R, Kannan V. Bioremediation of petroleum refinery effluent by *Planococcus halophilus.* Afr J Biotechnol. 2011; 10(44): 8829-8833.

28. Lazar I, Doborta S, Voicu A, Stefanescu M, Sandulescu L, Petrisor IG. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. J Petroleum Sci Eng. 1997; 22: 151-160.

29. Gibbs CF. Quantitative studies on marine oil biodegradation of crude oil. I. Nutrient limitation at 14ºC. Proc Roy Soc. 1975; 188: 61-82.

30. Atlas RM. Stimulated petroleum biodegradation. Crit Rev Microbiol. 1977; 5(4): 86-371.

31. Solanas M, Marc V, Espuny M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation during bioremediation of heavily creosote- contaminated soil. Appl

Environ Microbiol. 2005; 11(71): 7008-7018.

32. Rozlyn FC, Stephane M, Fedroak M. Aerobic biodegradation of 2-2-dithiodibenzoic acid produced from dibenzothiophene methabolite. Appl Environ Microbiol. 2006; 1(72): 491-496.

33. Mohana S, Chirayu D, Madamwar D. Biodegradation and decolourization of anaerobically treated Distillery spent wash by a novel bacterial consortium. Bioresource Technol. 2006; 2 (98): 333-339.

34. Qin X, Tang JC, Li DS, Zhang QM. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. Lett Appl Microb. 2011; 55: 210-217.

35. Amozegar MA, Akhavansepahi A, Akhavansepahi F. Isolation and identification of soil bacteria halotolerant parser benzene oil wells Qom. Quarterly J Microbiol Knowledge. 2009; 3 (1): 33-39. [In Persian]

36. Ryu A, Wook H, Yang H, Jooan Y, Sukcho K. Isolation and characterization of psychrophilic and halotolerant *Rhodococcus Sp.* YHLT-M. Microbiol Biotechnol. 2006; 16(4): 605- 612.

37. Safari M, Ahmadi Asbchin S, Soltani N. The ability *of Cyanobacteria Schizothrix vaginata* ISC 108 for crude oil biodegradation. Iran J Health Environ. 2014; 3(7): 363-373. [In Persian]

38. Amini A, Tahmorspour A, Abdolahi A, Dodi M. Isolation, characterization and evaluation of bio-molecular anthracene by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from soil of the refinery. J Microbial World. 2013; 3: 228-236.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Original Article

Isolation and identification of petroleum hydrocarbon degrading bacteria from oil reservoirs located at Asmari, Ahwaz

Rahil kiyanpour Berjoee[1], Hossein Motamedi[2], Zahra bamzadeh[3]

[1]MS.c., Department of Biology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Bioremediation is a technology to remove oil pollution. Microbial bioremediation id the best technology to remove contaminants in which pollutants are converted to non-toxic chemicals in expenses of lowest amount of energy, chemicals and time. This study aimed to isolate and identify the petroleum hydrocarbons degrading bacteria from oil reservoirs located at Asmari Ahwaz.

Materials & Methods: This field study was performed in the oil reservoirs located at Asmar, Ahvaz. The primary isolation was performed using a salt containing base medium through a multistep process, and the salt tolerance of isolates were tested by this medium. The elimination of the hydrocarbons by isolated bacteria were studied using gas chromatography. The identity of bacteria was determined based on biochemical tests and sequencing of *16S rRNA* gene.

Results: In this study, a halotolerant Gram-positive bacteria, belonged to *Streptomyces,* was isolated from the field. This isolate showed an acceptable growth into 7.5% salt concentration and was able to use oil as the sole source of carbon. Also, this strain was able to reduce the level of hydrocarbons to 71.58 % through incubation in the saline medium for 10 days.

Conclusion: According to the results, the isolated strain is capable to tolerate high concentrations of salts and is desirable to remove the hydrocarbons, which is beneficiary due to the difference in salt concentration in contaminated areas. As a result, this isolate can be useful for removal of pollutants from the environment and reduction of their side effects on life.

Keywords: Biodegradation, Crude oil degrading bacteria, Hydrocarbons.

Correspondence to: Rahil kiyanpour Berjoee

Tel: +98 9359138187

E-mail: kiyanpourr@gmail.com

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 145-155.