تصفیه زیستی نفت خام به کمک باکتری‌های جدا شده از اسفنج بومی خلیج فارس *Dictyonella* sp.

خانمناز عبادی[۱]، ماندانا زارعی[۲*]، علی محمد صنعتی[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، استان بوشهر، پست الکترونیکی: khanomnaz.ebadi@gmail.com

۲- استادیار گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، استان بوشهر، پست الکترونیکی: zarei.mandana@yahoo.com.

۳- استادیار گروه محیط زیست، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، استان بوشهر، پست الکترونیکی: am_sanati@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۶ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۱*

چکیده

هدف از این مقاله، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های همراه با اسفنج بومی خلیج فارس با توانایی تجزیه زیستی نفت خام است. در این پژوهش اسفنج *Dictyonella* sp. از عمق حدود ۱۰ متری خلیج فارس در سواحل جزیره خارکو جمع آوری شد. سپس نمونه اسفنج آماده سازی گردید و پس از جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری‌های همراه، فعالیت تجزیه کنندگی آنها در محیط نمکی حداقل با افزودن نفت خام به عنوان تنها منبع کربن محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور به دست آوردن میزان تجزیه نفت خام، از روش اسپکتروفتومتری و اندازه‌گیری وزن خشک استفاده شد. نتایج نشان داد که هر سه سویه به دست آمده توانایی تجزیه زیستی نفت خام را دارا بوده و بالاترین میزان رشد، در محیط نمکی حداقل حاوی نفت پالایش شده و نفت خام مربوط به سویه KE1 و کمترین مربوط به سویه KE2 بود. شاخص امولسیون سازی برای سه سویه باکتری جداسازی شده KE1، KE2 و KE4 تفاوت معنی‌داری نداشته و به ترتیب (±SE میانگین) ۳۷/۵±۰/۴، ۳۱/۴۵±۰/۶ و ۳۶/۵۵±۰/۴ به دست آمد. سویه KE4 به طور قابل توجهی توانایی تجزیه نفت خام را دارا بوده و بر اساس اندازه‌گیری وزن خشک، ۷۵/۹ ٪ از نفت خام را تجزیه نمود. شناسایی مولکولی باکتری‌های به دست آمده مشخص نمود که سویه‌های KE1، KE2 و KE4 با درصد تشابه بالای ۹۰٪ بیشترین قرابت را به ترتیب با سویه‌های *Georgenia satyanarayanai*JC82، *Pseudomonas rhodesiae*CIP104664 و *Gordonia terrae*ATCC25594 دارا هستند.

کلمات کلیدی: شاخص امولسیون سازی، وزن خشک، اسپکتروفتومتری، خارکو، خلیج فارس.

۱. مقدمه

خلیج فارس دارای ۶۸-۵۵٪ از ذخایر نفتی جهان و همچنین بیش از ۴۰٪ منابع گازی است. از این رو بر اساس منابع هیدروکربنی، غنی‌ترین منطقه در جهان محسوب می‌شود. بنابراین سواحل و جزایر جنوبی ایران که در محدوده خلیج فارس قرار دارند، همواره در معرض آلودگی‌های نفتی هستند. از این جهت مطالعه وضعیت هیدروکربن‌های آلوده‌کننده از اهمیت خاصی برخوردار است (سالاری‌جو و همکاران، ۱۳۹۵). انتقال و ذخیره هیدروکربن‌های نفتی در مناطق ساحلی توجه زیادی به خود جلب کرده است، زیرا سواحل نقش مهمی در چرخه جهانی نفت ایفا می‌کنند. از جمله مهمترین منابع آلوده کننده سواحل و دریاها، هیدروکربن‌های تصفیه نشده ناشی از فاضلاب‌های خانگی و صنعتی، فعالیت‌های استخراجی و حمل و نقل دریایی هستند که وضعیت نگران کننده‌ای را به وجود می‌آورند (عظیمی یانچشمه و همکاران، ۱۳۹۳). هیدروکربن‌های نفتی به علت از دست دادن گروه‌های عملکردی و حلالیت کم در آب واکنش‌ناپذیر بوده و به طور عمده در ۴ گروه قرار می‌گیرند (Liu et al., 2014). هیدروکربن‌های اشباع شده تنها با یک پیوند کربن-کربن، بزرگترین گروه را می‌سازند و در بین آن‌ها آلکان‌های راست زنجیر یا نرمال غالب بوده و به راحتی تجزیه می‌شوند. هیدروکربن‌های آلیفاتیک شامل: ان-آلکان‌ها، آلکن‌ها، آلکان‌های شاخه‌دار و هیدروکربن‌های آلیفاتیک حلقوی هستند (Andelin and Niblock, 1991). هیدروکربن‌های آروماتیک PAHS شامل آن دسته از ترکیباتی هستند که دو یا بیشتر از دو حلقه بنزن دارند و در آرایش خطی، زاویه‌دار و یا خوشه‌ای قرار گرفته‌اند (Eisler, 1987). این گروه بخش کوچکی از نفت را تشکیل می‌دهند و برای گیاهان و حیوانات سمی هستند اما باکتری‌ها می‌توانند PAHS را به طور کامل به توده زنده CO_2 و H_2O تبدیل نمایند (Atlas and Hazen, 2011).

آسفالتن شامل ترکیباتی هستند که یا به صورت زیستی قابل تجزیه نیستند و یا خیلی آهسته تجزیه می‌شوند. رزین شامل ترکیبات نفتی حاوی نیتروژن، سولفور و اکسیژن است و باعث محدودیت تجزیه میکروبی می‌شود. نفت سبک ممکن است حاوی حدود ۵۰-۱٪ آسفالتن و رزین باشد و نفت سنگین یا هوازده ممکن است تا ۲۵٪ آسفالتن و ۲۰٪ درصد رزین داشته باشد (Andelin and Niblock, 1991). روش‌های طبیعی پاکسازی آلودگی‌های نفتی شامل: تبخیر، اکسیداسیون نوری[1]، پراکندگی، انحلال، امولسیون شدن، جذب و تجزیه زیستی[2] توسط میکروارگانیسم‌های بومی است (Mills et al., 2003). تجزیه زیستی روشی مفید برای از بین بردن آلودگی هیدروکربن-های نفتی در محیط‌های آبی بوده و در دهه‌های گذشته، باکتری-های دریایی با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌ها از نقاط مختلف دنیا جدا شده‌اند. مهمترین اصل در پاکسازی زیستی، استفاده از میکروارگانیسم‌های دریایی بومی منطقه آلوده است که قادر هستند در شرایط طبیعی منطقه، زنده مانده و به فعالیت خود ادامه دهند (Vignesh et al., 2011).

پاکسازی زیستی یک فناوری بین رشته‌ای است و موفقیت آن وابسته به وجود یک گروه متخصص از رشته‌های مختلف به ویژه رشته‌های میکروبیولوژی، مهندسی، بوم‌شناسی، زمین‌شناسی و شیمی است. همچنین بهبود دانسته‌ها درباره بوم‌شناسی، فیزیولوژی، تکامل، بیوشیمی و ژنتیک میکروب‌ها، میزان موفقیت در استخراج متابولیت‌های میکروبی برای اهداف زیست‌محیطی را افزایش می‌دهد (Garbisu and Alkorta, 2003). قبل از تصفیه زیستی عواملی مانند نوع و غلظت نفت، شرایط آب و هوایی منطقه، نوع ساحل آلوده، میزان مواد مغذی (نیتروژن، فسفر و اکسیژن) و pH می‌بایست بررسی گردد (Swannell et al., 1996). زمانی‌که ریزش نفتی اتفاق می‌افتد، نتیجه آن افزایش در میزان کربن و تحریک رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت حاضر در آن محل است. با این وجود پس از مدتی رشد میکروارگانیسم‌ها به علت کمبود نیتروژن و فسفر محدود می‌شود. تحریک میکروبی[3]، اضافه کردن مواد مغذی مورد نیاز برای میکروارگانیسم‌های بومی تجزیه‌کننده می‌باشد و اگر این مواد مغذی در غلظت مناسب افزوده شوند، به طوری که باعث شکوفایی جلبکی نگردند، میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده قادر به حداکثر رشد و بیشترین میزان تجزیه خواهند بود (Tsai et al., 2009; Sutiknowati, 2007). افزایش میکروبی[4]، شامل اضافه کردن گروهی از سویه‌های میکروبی غیربومی یا مهندسی شده به لحاظ ژنتیکی است. این روش در مواقعی مورد استفاده قرار می-گیرد که میکروارگانیسم‌های بومی منطقه آلوده شناسایی نشده‌اند و یا ظرفیت متابولیکی لازم برای فرایند تصفیه را ندارند (Thapa

[1] Photooxidation
[2] Biodegradation
[3] Biostimulation
[4] Bioaugmentation

et al., 2012; Ramadha et al., 2013). مهمترین مزیت تصفیه زیستی نسبت به سایر روش‌ها، صرفه‌جویی در هزینه و زمان است و بر خلاف روش‌های غیرزیستی به طور مداوم محل‌های آلوده را پاک می‌کند. علاوه‌براین دوستدار محیط زیست بوده و آلودگی‌ها را بدون انتقال به محل دیگر از بین می‌برد (Garapati, 2012). باکتری‌های تجزیه کننده نفت تا زمانی که منبع نفتی در محیط وجود دارد فرایند تصفیه را انجام داده و پس از اتمام نفت، یکباره خودشان از بین می‌روند (Singh, 2011).

اسفنج‌ها با ۱۰۷ جنس و بیش از ۱۵ هزار گونه یکی از ابتدایی‌ترین و در عین حال شگفت انگیزترین موجودات پر سلولی محسوب می‌شوند. این جانوران در مسیر اصلی تکامل جانوری قرار ندارند، بلکه یک مسیر فرعی را می‌سازند که به انواع دیگری اشتقاق نیافته اند (Taylor et al., 2007). اسفنج‌ها مقدار زیادی از آب دریا را فیلتر می‌کنند که می‌تواند حاوی ۱۰۶×۵-۱ باکتری در هر میلی‌لیتر باشد. در برخی موارد، میکروب‌ها تا ۵۰٪ از حجم بافت اسفنج را تشکیل می‌دهند. همراهی انواع میکروارگانیسم‌ها با اسفنج‌های میزبان یک رابطه سودمند برای هر دو طرف است. سطوح و فضاهای درونی اسفنج‌ها غنی از مواد مغذی است بنابراین، میکروارگانیسم‌ها از اسفنج‌ها به عنوان منبع مواد مغذی و جایگاه امنی برای زیستن استفاده می‌کنند و در مقابل از طریق هضم درون سلولی، تثبیت نیتروژن، انجام فتوسنتز، تولید انواع متابولیت‌های ثانویه، به ثبات و پایداری اسکلت و تقویت سیستم دفاعی اسفنج‌ها کمک می‌نمایند (Wilkinson, 1980). باکتری‌های همراه با اسفنج بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی به ۳ گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول باکتری‌هایی هستند که مشابه باکتری‌های آب دریا در محیط اطراف اسفنج بوده و ویژه اسفنج‌ها نمی‌باشند. گروه دوم باکتری‌های درون‌سلولی و گروه سوم باکتری‌های موجود در بین مزوهیل می‌باشند. اسفنج‌ها به علت صافی‌خوار بودن در معرض انواع آلودگی‌های آلی موجود در آب قرار می‌گیرند و می‌توانند این آلودگی‌ها را تجمع دهند. بنابراین برخی میکروب‌های موجود در اسفنج یا خود اسفنج در مقابل این آلودگی‌ها پاسخ می‌دهند و آنزیم‌های هیدرولیزکننده تولید می‌کنند که آلودگی‌های آلی را به مواد مغذی تبدیل می‌کنند (Wang, 2006). با توجه به اینکه در ایران تاکنون مطالعه‌ای روی میکروارگانیسم‌های همراه اسفنج با توانایی تجزیه زیستی نفت خام صورت نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور رسیدن به این هدف انجام شده است.

۲. مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های همراه: نمونه‌های سالم و زنده اسفنج *Dictyonella* sp. از عمق حدود ۱۰ متری خلیج فارس در اطراف جزیره خارکو با مختصات جغرافیایی ۲۹ درجه و ۲۴ دقیقه عرض شمالی و ۵۰ درجه و۳۱ دقیقه طول شرقی توسط عملیات غواصی جمع‌آوری شدند و روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. لازم به ذکر است که حمل نمونه‌ها تا حدودی به صورت موقت، میکروارگانیسم‌ها را غیر فعال می‌کند. برای فعالیت مجدد میکروارگانیسم‌ها قبل از استفاده از مزوهیل، نمونه اسفنج به مدت ۲ ساعت در آون در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظورجداسازی میکروارگانیسم‌های همراه با اسفنج، ۱ سانتیمتر مکعب از بافت اسفنج از قسمت داخلی مزوهیل با استفاده از چاقوی استریل جدا شد و ۳ بار با آب دریای استریل شستشو داده شد. پس از انجام مراحل آماده‌سازی نمونه، بافت هموژنیزه اسفنج با غلظت‌های مختلف، در ۴ نوع محیط کشت متفاوت نوترینت آگار، امرسون آگار، مارین آگار+ نفت (۲٪حجمی حجمی) و مارین آگار+ گلیسرول (۲٪حجمی حجمی) کشت شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز در گرم‌خانه قرار گرفتند. مارین آگار محیط کشت اختصاصی برای رشد بیشتر میکروارگانیسم‌های دریایی است که با توجه به عدم وجود این محیط کشت به صورت آماده در داخل کشور، ترکیبات آن به صورت تغییر یافته تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات محیط مارین آگار بر حسب گرم در لیتر به صورت: پپتون ۵ گرم، پودر عصاره مخمر ۹ گرم، کلریدسدیم ۱۹/۴۵ گرم، کلریدمنیزیم ۸/۸ گرم، سولفات‌سدیم ۳/۲۴ گرم، کلریدکلسیم ۱/۸ گرم، کلریدپتاسیم ۰/۵۵ گرم، کربنات‌سدیم ۰/۱۶ گرم، برمیدپتاسیم ۰/۰۸ گرم، کلریداسترانسیم ۰/۰۳۴ گرم، اسیدبوریک ۰/۰۲۲ گرم، فلوریدسدیم ۰/۰۰۲۴ گرم، نیترات‌آمونیوم ۰/۰۰۷۶ گرم، دی‌سدیم‌هیدروژن‌فسفات ۰/۰۰۸ گرم، آگار ۱۵ گرم و pH محیط کشت به صورت ۰/۲±۷/۶ تهیه گردید. پس از رشد، کلنی‌های مختلف ابتدا از نظر ریخت‌شناسی مورد بازبینی قرار گرفتند و قارچ‌ها از باکتری‌ها جدا شدند و منحصرا کلنی‌های باکتریایی به صورت مجزا در محیط کشت جدید با روش خطی کشت داده شدند و سپس با تکرار حداقل ۳ بار کشت خطی از هر کلنی، نمونه‌های خالص سازی شده به دست آمد. همچنین پس از اضافه کردن باکتری‌های تجزیه کننده به محیط نمکی

حداقل حاوی نفت خام، به طور مرتب باکتری‌های موجود در محیط نفتی، با استفاده از سواپ دوباره کشت داده شد تا رشد هر گونه باکتری دیگر یا قارچ در محیط شناسایی شود. این کار باعث اطمینان از تجزیه نفت توسط باکتری‌های همراه اضافه شده گردید و تجزیه توسط سایر باکتری‌ها یا قارچ‌ها را منتفی نمود (Cheng et al., 2008).

جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت: با توجه به اینکه اغلب باکتری‌های تولید کننده بیوسورفاکتانت توانایی تجزیه نفت خام را نیز دارند به همین منظور از اندازه‌گیری شاخص امولسیون‌سازی برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت استفاده شد. برای انجام این آزمایش سویه‌های باکتری در محیط نوترینت براث به مدت یک هفته کشت یافتند و سپس محیط کشت‌ها سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برداشت شد. در مرحله بعد میزان ۶ میلی‌لیتر نفت خام سبک ایران (به دست آمده از چاه‌های نفت اطراف منطقه گچساران) در فالکن-های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا با دمای محیط هم‌دما شود، همچنین ارتفاع نفت نیز برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس میزان ۶ میلی‌لیتر محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ روی نفت ریخته شد و دوباره ارتفاع آن اندازه‌گیری و به مدت ۲ دقیقه و با سرعت زیاد توسط ورتکس مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت در مکان ثابت قرار گرفتند. در پایان میزان فعالیت امولسیون کنندگی سویه-ها، با اندازه‌گیری ارتفاع لایه امولسیون شده تقسیم بر ارتفاع کل و بر حسب درصد محاسبه گردید (Dhail and Jasuja, 2012).

به منظور بررسی توانایی باکتری‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی، باکتری‌ها در محیط نمکی حداقل با ۲٪ نفت پالایش شده و سپس در محیط نمکی حداقل با ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت یافتند و رشد آن‌ها از طریق اندازه‌گیری کدورت در طول موج ۶۲۰ نانومتر به صورت یک روز در میان، با استفاده از اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات محیط نمکی حداقل بر حسب گرم در لیتر به صورت کلرید سدیم ۵ گرم، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات ۵ گرم، دی‌آمونیوم‌سولفات ۱ گرم، دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات ۱ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲۵ گرم، سدیم نیتریت ۲ گرم، کلرید آهن ۰/۰۲۰ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲۰ گرم، درصد نفت خام سبک و pH نهایی محیط کشت به صورت (±SE) ۲±۷/۲ بود. به منظور ترسیم نمودار رشد میکروارگانیسم‌ها، میزان رشد آن‌ها به صورت غیر مستقیم توسط اندازه گیری میزان کدورت با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و به مدت ۸ روز متوالی انجام گرفت (Pathak and Bhatnagar, 2011). لازم به ذکر است که در انکوباتور به همراه نمونه‌ها یک نمونه شاهد نیز قرار داده شد و رشد نمونه‌ها بر اساس کدورت نمونه باکتری و شفاف بودن نمونه شاهد با استفاده از اسپکتروفتومتری بررسی گردید. همچنین دستگاه اسپکتروفتومتری با استفاده از نمونه شاهد صفر شد و رشد نمونه نسبت به آن سنجیده شد.

اندازه‌گیری میزان حذف نفت‌خام: پس از ۷ روز از کشت سویه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نمکی حداقل، میزان نفت باقی مانده در محیط، با استفاده از ۵۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل شد و پس از مخلوط کردن، با استفاده از قیف جداکننده فاز آلی و آبی از هم جدا شدند. فار آبی حاوی میکروارگانیسم‌ها و محیط کشت بود و دور ریخته شد. فاز آلی که حاوی نفت حل شده در دی‌کلرومتان بود، استخراج گردید و غلظت نفت استخراج شده نسبت به شاهد و در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. همچنین پس از خشک شدن نمونه‌های نفت خام، در دمای اتاق و به طور طبیعی، وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری گردید. لازم به ذکر است که در تمامی آزمایشات، در شرایط کاملا یکسان از نمونه شاهد فاقد باکتری نیز استفاده گردید و وزن خشک به دست آمده بر اساس وزن خشک شاهد ارزیابی شد. بنابراین بخش قابل تبخیر نفت در هر دو نمونه کنترل و شاهد وجود داشت و میزان تجزیه نسبت به شاهد اندازه گیری گردید (Chandm Raza and Nusrt, 2010).

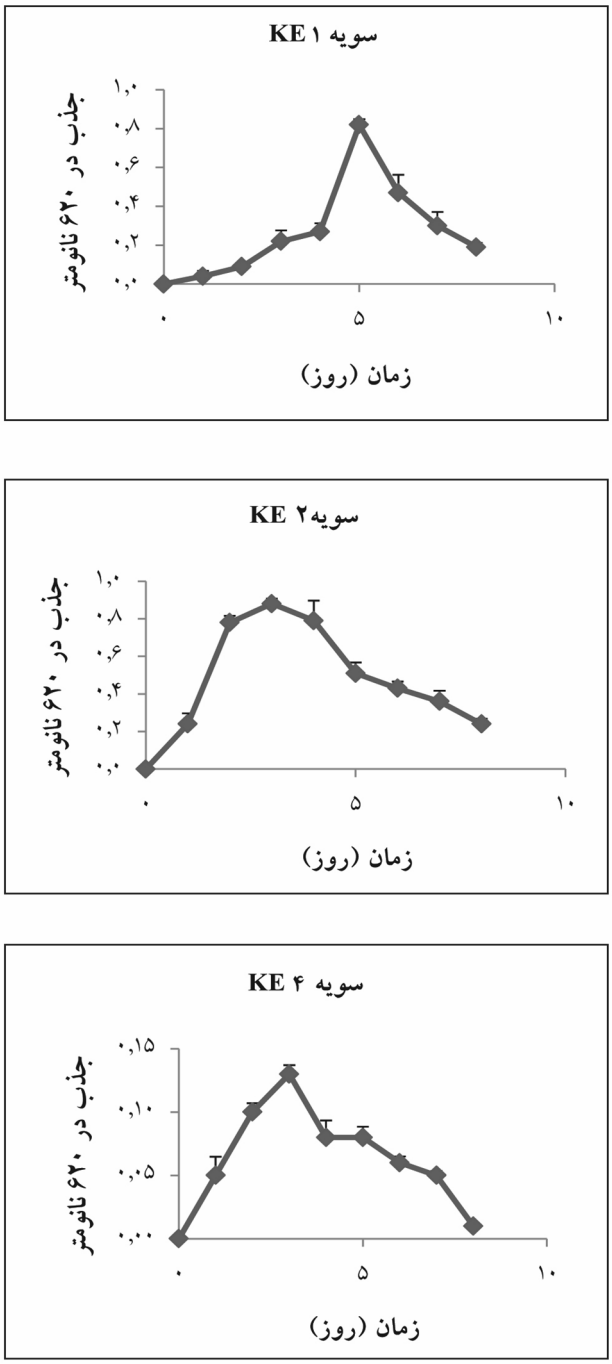
شناسایی سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام: سویه‌های تجزیه-کننده نفت‌خام به لحاظ ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. برای شناسایی مولکولی از آغازگرهای عمومی ۲۷F و ۱۴۹۲R و تکثیر ژن ۱۶SrRNA استفاده شد. واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تکثیر یافت. غلظت مواد مصرف شده در PCR شامل ۵ میکرولیتر بافر (۱۰x)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر dNTP، ۳ میکرولیتر کلریدمنیزیم، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم تکپلی‌مراز، ۴ میکرولیتر DMSO، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۲۹/۴ آب دوبار تقطیر استریل و برنامه دمایی PCR به صورت ۳۰۰ ثانیه واسرشتی اولیه در دمای ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه واسرشتی در دمای ۹۴درجه، ۶۰ ثانیه مرحله اتصال در دمای ۵۵ درجه، ۹۰ ثانیه مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه و ۳۰۰ ثانیه طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه بود.

محصول PCR پس از خالص‌سازی توسط شرکت تکاپو زیست به شرکت بیونیردر کره جنوبی ارسال گردید و نتایج تعیین توالی ژن ۱۶SrRNA با ۲ بار خوانش به دست آمد. به منظور بررسی نتایج به دست آمده از توالی‌یابی و بازسازی توالی‌های DNA از نرم‌افزارهای کروماس[1]، مفت[2] و رید سکوئنس[3]، برای تعیین شباهت گونه‌های به دست آمده از بلاست و برای رسم درخت فیلوژنی و محاسبه فاصله ژنتیکی از نرم‌افزار مگا ۶ استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمام آزمایشات انجام شده در این مطالعه حداقل ۳ بار تکرار شده و داده های ذکر شده، میانگینی از ۳ بار تکرار هستند که انحراف معیار آنها محاسبه و ذکر شده است.

۳. نتایج و بحث

شناسایی اسفنج: نمونه اسفنج مورد استفاده به منظور شناسایی به موسسه Naturalis Biodiversity Center در کشور هلند ارسال گردید و به عنوان جنس *Dictyonella* از خانواده Dictyonellidae، راسته Halichondrida، رده Demospongiae و شاخه Porifera مورد شناسایی قرار گرفت. این گروه شامل اسفنج‌هایی هستند که متراکم، نرم، ظریف و با اندازه‌ای حدود ۲۲ سانتی‌متر بوده که به راحتی تکه تکه می‌شوند. رنگ آن‌ها قهوه‌ای شکلاتی با سطح خارجی تیره و سطح داخلی کمی روشن است و اسکلت آن‌ها شامل اکتوزوم و بدون درم ویژه، کوانوزوم‌های غارمانند با کانال‌های خطی صاف و اندازه ۳ میلی‌متر و اسپیکول-های ۱۴-۵ µm × ۱۴۰۰-۷۰۰ است (Kefalas and Castritsi-Catharios, 2007).

نمودار رشد باکتری‌ها: یکی از روش‌های مناسب برای بررسی رشد، اندازه‌گیری کدورت است. Jalilzadeh و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود برای بررسی فعالیت تجزیه‌کنندگی و رشد باکتری *Bacillus subtilis* sp. میزان کدورت آن را در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری کردند. همچنین در این پژوهش نمودار رشد بر اساس اندازه‌گیری کدورت و در مدت ۸ روز ترسیم شد. سویه KE1 تا ۴ روز، رشد کندی داشت و در روز پنجم به حداکثر رشد خود رسید. سویه KE2 فاز تاخیری نداشت و پس از ۳ روز به حداکثر رشد خود رسید. پس از آن رشد به تدریج کاهش یافت و پس از روز پنجم وارد فاز سکون گردید. سویه KE4 نیز بدون فاز تاخیری، پس از ۳ روز به حداکثر رشد خود دست یافت. پس از روز چهارم وارد مرحله سکون شد و پس از روز هشتم وارد فاز مرگ گردید که بر خلاف میزان رشد کم، بالاترین میزان تجزیه را در بین سویه‌ها دارا بود. نمودار رشد سویه‌ها در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱: نمودار رشد سویه‌های KE1، KE2 و KE4

[1] Chromas
[2] MAFFT
[3] ReadSeqense

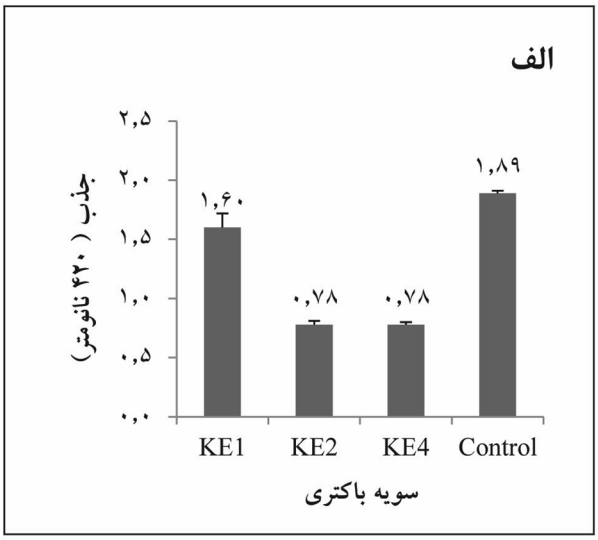
جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام: به منظور جداسازی باکتری‌هایی با بالاترین میزان تجزیه نفت، ابتدا سویه-های جداسازی شده در محیط نمکی حداقل حاوی ۲٪ نفت پالایش شده که دارای ترکیبات سبک است، کشت یافتند و سپس، سویه‌هایی که در این غلظت نفت رشد بالاتری داشتند، در محیط نمکی حداقل حاوی ۱٪ نفت خام سبک ایرانی، ۳ بار کشت داده شدند. بر اساس میزان رشد باکتری‌ها در نفت خام و نتایج حاصل از شاخص امولسیون‌سازی، ۳ سویه تجزیه‌کننده نفت انتخاب شدند. نتایج میانگین حاصل از رشد باکتری‌ها در محیط حاوی نفت پالایش شده و نفت خام و شاخص امولسیون‌سازی در جدول ۱ آورده شده است.

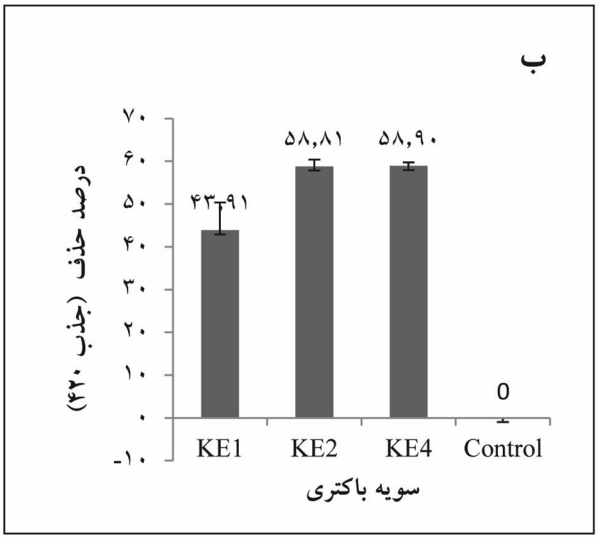
جدول ۱: میانگین رشد باکتری‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر در محیط حاوی ۱ ٪ و ۲ ٪ نفت خام سبک و شاخص امولسیون‌سازی آن‌ها (در تمام آزمایشات از نمونه شاهد استفاده شده است).

سویه	رشد در ۲٪ نفت پالایش شده	رشد در ۱٪ نفت خام (±SE میانگین)	درصد امولسیون
KE1	۱/۵	۰/۸۲±۰/۰۳	۳۷/۵±۰/۴
KE2	۰/۹۸	۰/۸۸±۰/۰۳	۳۱/۴۵±۰/۶
KE4	۱	۰/۱۳±۰/۰۱	۳۶/۵۵±۰/۴
شاهد	۰	۰	۰

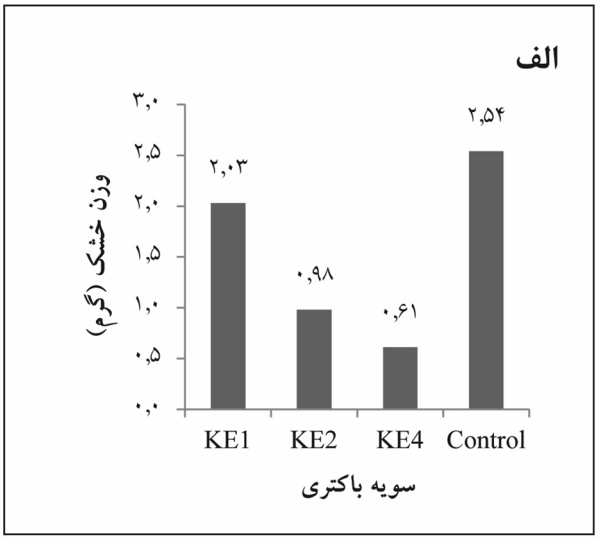
کارایی بیوسورفاکتانت تولید شده توسط باکتری‌ها با اندازه-گیری فعالیت امولسیون بررسی می‌شود که با افزایش دسترسی زیستی هیدروکربن‌ها برای باکتری‌ها، میزان تجزیه‌زیستی را افزایش‌می‌دهد (Dhail and Jasuja, 2012). این شاخص با افزایش رشد باکتری‌ها افزایش یافته و نشان‌دهنده تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده است و به طور عمده در مرحله رشد باکتری‌ها تولید شده و از متابولیت‌های اولیه توده سلولی می‌باشد. این شاخص در مطالعات Ahmed و همکاران (۲۰۱۴) در مورد باکتری *Enterobacter cloacaeE1* که یک باکتری تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی بود، ٪۶۲ گزارش شد. همچنین Akhavan Sepahi و همکاران (۲۰۰۸) در مورد دو سویه *Bacillus*S35 و *Bacillus*S6 به ترتیب ۸۵٪ و ۷۱٪ گزارش نمودند. شاخص امولسیون‌سازی در این مطالعه برای ۳ سویه باکتری مورد مطالعه نزدیک هم بود و بالاترین شاخص مربوط به سویه KE1 و کمترین مربوط به سویه KE2 به دست آمد. بالاترین میزان رشد در محیط نمکی حداقل حاوی نفت پالایش شده و نفت خام مربوط به سویهKE1 بود. اما سویه KE4 علی-رغم رشد خوب در محیط حاوی نفت پالایش شده، در محیط حاوی نفت خام رشد خوبی نداشت و کمترین میزان رشد را دارا بود.

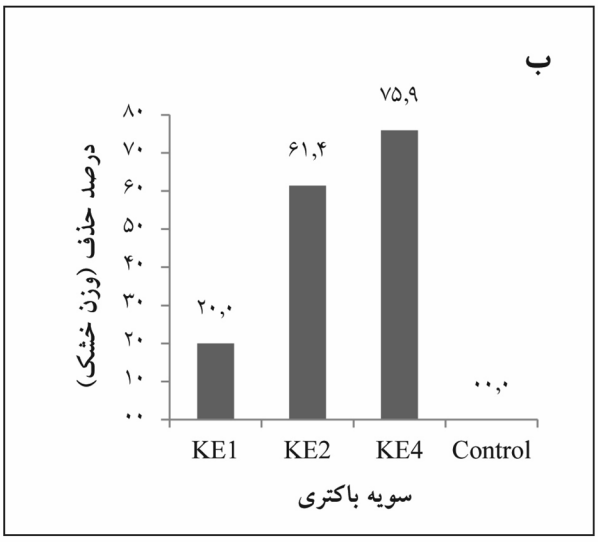
اندازه‌گیری میزان حذف نفت خام: میزان حذف نفت خام بر اساس خواندن غلظت نفت باقی‌مانده در طول موج ۴۲۰ نانومتر و اندازه‌گیری وزن خشک بررسی شد. محیط کشت‌هایی که بالاترین میزان تجزیه نفت را داشتند، دارای وزن خشک و جذب پایین‌تری بودند. جذب نمونه‌ها از جذب شاهد کم شده و تقسیم بر جذب شاهد گردید و میزان حذف نفت بر حسب درصد به دست آمد. در مورد وزن خشک نمونه‌ها، میزان نفت خشک شده اندازه‌گیری شد و از وزن نفت خشک شاهد کم شد و میزان خالص تجزیه به دست آمد. نتایج حاصل به صورت میانگین در شکل‌های ۲ و۳ آمده است.





شکل ۲: الف) میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر ب) درصد حذف نفت خام





شکل ۳: الف) وزن خشک نمونه‌ها ب) درصد حذف بر اساس وزن خشک

در مطالعه انجام شده توسط Latha و Kalaivani (۲۰۱۲)، نفت باقی‌مانده در محیط، با استفاده از ان-هگزان استخراج شد، سپس با استفاده از سدیم‌سولفات بدون آب، آبگیری انجام شد و در مرحله بعد با استفاده از دستگاه تبخیرکننده در فشار پایین، آن را خشک نمودند. وزن نفت به دست آمده از نفت اضافه شده به محیط کشت کسر گردید و نتایج نشان داد که در نمونه‌هایی که وزن خشک پایین‌تری داشتند، میزان حذف نفت بیشتر بود. در مطالعه حاضر نیز وزن نمونه شاهد ۲/۵۴ گرم و وزن نمونه حاوی سویه KE4، ۰/۶۱ گرم محاسبه گردید که بر اساس آنالیز وزنی، ۷۵/۹٪ از نفت موجود در محیط حذف شده بود. Santis و همکاران (۲۰۱۵) و Hassanshahian و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعات خود میزان حذف نفت خام را با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری کردند و نتایج نشان داد نمونه هایی که تجزیه بالایی داشتند، دارای جذب پایین‌تری بودند. در مطالعه حاضر نیز میزان حذف نفت خام با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید و نتایج نشان داد که در نمونه‌هایی که جذب پایین‌تری داشتند، میزان حذف نفت بیشتر بود. در نمونه‌های حاوی سویه KE4 و KE2 که جذب پایین‌تری نسبت به سویه KE1 داشتند، میزان حذف نفت خام بیشتری به دست آمد.

۳-۱ شناسایی سویه‌های تجزیه‌کننده نفت خام

سویه‌ها به لحاظ ریخت‌شناسی و با استفاده از تست‌های رنگ‌آمیزی گرم، همولیز، لاکتوز، گلوکز، اوره، اکسیداز، ایجاد رنگدانه، تشکیل هاگ، کاتالاز، کراتین، آرابینوز و هیدرولیز نشاسته مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل توالی‌های به دست آمده با استفاده نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک مشخص نمود که مشابه‌ترین سویه به KE1، سویه ثبت شده در NCBI با نام علمی *Georgenia satyanarayanai* JC82 است. نزدیکترین سویه به KE2 باکتری*Pseudomonas rhodesiae* CIP 104664 و مشابه‌ترین سویه به KE4 باکتری *Gordonia terrae* ATCC 25594 بود. نتایج حاصل از شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی به ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۲: مشخصات بیوشیمیایی سویه‌های تجزیه کننده نفت خام

سویه	مشخصات بیوشیمیایی
KE1	گرم مثبت، همولیز مثبت، گلوکز و لاکتوز منفی، اکسیداز منفی، ایجاد رنگدانه سبز
KE2	گرم منفی، کراتین و آرابینوز منفی، هیدرولیز نشاسته منفی، تشکیل‌دهنده هاگ
KE4	میله‌ای گرم مثبت، کاتالاز مثبت، عدم تشکیل هاگ

جدول۳: نزدیک‌ترین سویه‌های پایگاه داده با توالی ژن ۱۶SrRNA باکتری‌های توالی-یابی شده

نام سویه	نزدیک‌ترین سویه	فاصله ژنتیکی	درصد تشابه
KE1	*Georgenia satyanarayanai* JC82	۰/۰۵۵	۹۴
KE2	*Pseudomonas rhodesiae* CIP 104664	۰/۰۱۴	۹۹
KE4	*Gordonia terrae* ATCC 25594	۰/۲۲	۹۰

نزدیک‌ترین سویه به باکتری جدا شده KE1 با ۹۴٪ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۰۵۵ سویه *Georgenia satyanarayanai*JC82 است. این سویه در سال ۲۰۱۲ از رسوبات در هند جداسازی و در محیط نوترینت آگار و شرایط

هوازی خالص‌سازی گردید. کلنی‌های این سویه زرد کم‌رنگ، گرد، غیر متحرک، گرم مثبت، کاتالاز منفی و بهینه رشد آن در ۲٪ نمک و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. محتوی G+C این سویه، ۷۳/۴ و توانایی هیدرولیز نشاسته را دارا می‌باشد (Srinivas et al., 2012). مشابه‌ترین سویه به باکتری جدا شده KE2با ۹۹٪ شباهت و فاصله ژنتیکی۰/۰۱۴، *Pseudomonas rhodesiae*CIP104664 است. این سویه در سال ۱۹۹۶ از آب-های معدنی طبیعی جداسازی شد که یک سویه میله‌ای، متحرک، دارای یک تاژک قطبی، تولیدکننده کاتالاز و سیتوکروم‌اکسیداز، فاقد فعالیت همولیز، کاهنده نیترات، بدون رنگدانه فلورسانس و فاقد فعالیت هیدرولیز نشاسته بود (Coroler et al., 1996). نزدیک‌ترین سویه به باکتری KE4 با ۹۰٪ شباهت و فاصله ژنتیکی ۰/۲۲، *Gordoniaterrae*ATCC25594 است. در سال ۱۹۹۵ توالی DNA ریبوزومی کامل این سویه تعیین شد و با توالی‌های منتشر شده مقایسه گردید. روش‌های فیلوژنی و آنالیزهای BootStrap برای تایید این سویه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج نشان داد که جنس *Gordonia* یک تاکسون مونوفیلیتیک در بین شاخه‌ها، گرم مثبت و محتوی GC بالا است (Ruimy et al., 1995).

۴. نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که هر ۳ سویه باکتری جداسازی شده قابلیت تجزیه‌زیستی ترکیبات نفت خام را دارا هستند و سویه KE4 به طور قابل توجهی نفت موجود در محیط را تجزیه می-کند. همچنین با توجه به شباهت ۹۰٪ سویه KE4 با سویه *Gordonia terrae* ATCC 25594، ثبت شده در NCBI و فاصله ژنتیکی نسبتا قابل توجه ۰/۲۲ بین این دو سویه، به نظر می‌رسد انجام مطالعات مولکولی بیشتر، ممکن است منجر به معرفی سویه مذکور به عنوان یک سویه جدید در آینده گردد. نظر به اینکه اسفنج‌های بومی خلیج فارس به دلیل شرایط بوم‌شناختی خاص این دریا و موقعیت راهبردی آن، در زمره اسفنج‌های مقاوم به گرما، شوری و انواع آلودگی‌های زیست‌محیطی محسوب می-شوند، به نظر می‌رسد محیط بسیار غنی برای غربالگری و جداسازی انواع میکروارگانیسم‌ها با کاربردهای متفاوت باشند، که علاوه بر صرفه جویی قابل توجه در زمان و هزینه در مقایسه با جداسازی میکروارگانیسم‌های دریایی از رسوبات و یا آب، منجر به ایجاد مجموعه‌ای ارزشمند از انواع میکروارگانیسم‌های خلیج فارس خواهند شد.

منابع

سالاری جو، ز.؛ ریاحی بختیاری، ع.؛ قاسمپوری، م.، ۱۳۹۵. پایش زیستی آلکان‌های نرمال در تخم چهار گونه پرستوی دریایی جزیره فارور – خلیج فارس. نشریه اقیانوس‌شناسی، ۷ (۲۵): ۴۸-۴۱

عظیمی یانچشمه، ر.؛ ریاحی بختیاری، ع.؛ مرتضوی، ث.، ۱۳۹۳. تعیین غلظت و منشاء آلکان‌های نرمال در رسوبات سطحی سواحل جنوبی دریای خزر (بندر انزلی). نشریه اقیانوس‌شناسی، ۵ (۱۷): ۷۳-۶۳.

Ahmed, A.W.; Alzubaidi, F.S.; Hamza, S.J., 2014. Biodegradation of crude oil in contaminated water by local isolates of enterobacter cloacae.Iraqi Journal of Science, 55(3): 1025-1033.

Akhavan Sepahi, A.; Golpasha, D.; Emami, M.; Nakhoda, A., 2008. Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus* spp. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 5(3): 149-154.

Andelin, J.; Niblock, W.R., 1991. Bioremediation for marine oil spills. Congress Office of Technology Assessment. Washington, USA. 30P.

Atlas, R.M.; Hazen, T.C., 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history. Environmental science and technology, 45(16): 6709-6715.

Chandm Raza, A.; Nusrt, J., 2010. Evaluation of biodegradation potential of bacteria in crude oil contaminated soil. Biologia, 56(2): 77-85.

Cheng, N.; Fang, Z.; Huang, H.; Fang, Z.; Wu, X.; Bao, S., 2008. Phylogenetic diversity of bacteria and Archaea associated with the marine sponge *Pachychalina* sp. Polish Journal of Ecology, 56(3): 505-510.

Coroler, L.; Elomari, M.; Hoste, B.; Gillis, M.; Izard, D.; Leclerc, H., 1996. *Pseudomonas rhodesiae* sp. nov., a

oilfield, China. International Biodeterioration & Biodegradation, 87(28): 52-59.

Mills, M.A.; Bonner, J.S.; McDonald, T.J.; Page, C.A.; Autenrieth, R.L., 2003. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. Marine Pollution Bulletin, 46(7): 887-899 .

Pathak, H.; Bhatnagar, K., 2011. Alcaligenes-the 4T engine oil degrader. Journal of Bioremediation and Biodegradation, 2: 2011.

Ramadha, R.; Jabbar, R.; Abadulatif, N., 2013. Isolation, identification and assessment of the ability of local Streptomyces isolate from Iraq to utilize crude oil and diesel fuel. Al Gafarietal Scientific Research and Impact, 2(1): 9-28 .

Ruimy, R.; Riegel, P.; Boiron, P. Monteil, H.; Christen, R., 1995. Phylogeny of the genus *Corynebacterium deduced* from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 45(4): 740-746.

Santis, S.; Cappello, S.; Catalfamo, M.; Mancini, G.; Hassanshahian, M.; Genovese, L.; et al. 2015. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2): 377-387.

Singh, T., 2011. Removal of petroleum hydrocarbons by using microbial mats. MSc thesis, National Institute of Technology, Rourkela, 57P.

Srinivas, A.; Rahu, L.K.; Sasikala, C.; Subhash, Y.; Ramaprasad, E.; Ramana, C.V., 2012. Georgenia *satyanarayanai* sp. nov., an alkaliphilic and thermotolerant amylase-producing actinobacterium isolated from a soda lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(10): 2405-2409.

Sutiknowati, L.I., 2007. Hydrocarbon degrading bacteria: isolation and identification. Makara Sains, 11(2): 98-103 .

new species isolated from natural mineral waters. Systematic and Applied Microbiology, 19(4): 600-607.

Dhail, S.; Jasuja, N.D., 2012. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. African Journal of Environmental Science and Technology, 6(6): 263-266 .

Eisler, R., 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. US fish and wildlife service biological report, 85(1,11): 81.

Garapati, V.K., 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbons: MSc thesis, National Institute of Technology Rourkela. Odisha, 100P.

Garbisu, C.; Alkorta, I., 2003. Basic conceptson heavy metal soil bioremediation. European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection, 3(1): 58-66.

Hassanshahian, M.; Tebyanian, H.; Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, Yarrowia lipolytica PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin, 64(7): 1386-1391 .

Jalilzadeh Yengejeh, R.; Sekhavatjou, M.; Maktabi, P.; Arbab Soleimani, N.; Khadivi, S.; Pourjafarian, V., 2014. The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. International Journal of Environmental Research, 8(2): 509-514.

Kefalas, E.; Castritsi-Catharios, J., 2007. Taxonomy of some sponges (Porifera: Demospongiae) collected from the Aegean Sea and descriptionof a new species. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87(06): 1527-1538 .

Latha, R.; Kalaivani, R., 2012. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. Advances in Applied Science Research, 3(5): 2789-2795 .

Liu, H.; Yao, J.; Yuan, Z.; Shang, Y.; Chen, H.; Wang, F., et al. 2014. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang

soils: laboratory feasibility study. Journal of Environmental Engineering, 135(9): 845-853 .

Vignesh, R.; Haq, B. M.; Srinivasan, M., 2011. Biodegradation prospective of microbes. International Journal of Environmental Sciences, 2(2): 741 .

Wang, G., 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33(7): 545-551 .

Wilkinson, C.; Garrone, R., 1980. Nutrition of marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. Nutrition in the Lower Metazoa, 157P.

Swannell, R.; Lee, K.; McDonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiological Reviews, 60(2): 342-365 .

Taylor, W.; Radax, R.; Steger, D.; Wagner, M., 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2): 295-347.

Thapa, B.; Kc, A.K.; Ghimire, A., 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, 8(1): 164-170 .

Tsai, T.; Kao, C.; Surampalli, R.Y.; Chien, H., 2009. Enhanced bioremediation of fuel-oil contaminated