زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 3، پاییز 1396

بررسی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام همراه در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* جمع‌آوری شده از خلیج فارس (ناحیه ساحلی بندرعباس)

زینب بیات[1]، مهدی حسن شاهیان[2*]، مجید عسکری حصنی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان

2- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان

3- استادیار زیست شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان

* کرمان، صندوق پستی **76169133**

hasanshahi@gmail.com

(دریافت مقاله: 94/9/29 پذیرش مقاله: 95/4/27)

چکیده- نفت خام از چهار گروه ترکیبات اشباع، آروماتیک‌ها، رزین‌ها و آسفالتین‌ها تشکیل شده است. آلودگی نفتی اثرات جبران ناپذیری بر اکوسیستم دریا می‌گذارد. با توجه به آثار سوء آلاینده‌های نفتی بر محیط زیست دریایی، کنترل آنها در بنادر بسیار حائز اهمیت است. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده مؤثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکوشیمیایی است. در این پژوهش از آب دریا و دوکفه‌ای‌های خلیج فارس برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام، نمونه‌برداری شد. شمارش باکتری‌های تجزیه کننده و هتروتروف در نمونه‌های جمع‌آوری شده انجام گردید. باکتری‌های جداسازی شده با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. حذف نفت خام با روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی گازی برای سویه‌های برتر مشخص گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که که تراکم و تنوع باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده نفت خام در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* نسبت به محیط اطراف (آب دریا) بیشتر است. در این پژوهش در مجموع 11 باکتری تجزیه کننده جداسازی شد. تعداد 7 سویه شناسایی بیوشیمیایی شدند و دو سویه برتر تجزیه کننده بطور مولکولی شناسایی گردیدند که این سویه‌ها به جنس‌های *Shewanella* و *Alcanivorax* تعلق داشتند. این سویه‌ها در طی 15 روز بیش از نیمی از نفت خام را تجزیه نمودند. از این باکتری‌ها می‌توان برای پاک‌سازی مناطق دریایی آلوده به نفت البته با بررسی‌های میدانی بیشتر استفاده نمود.

کلید واژگان: آلودگی نفتی، تجزیه زیستی، دوکفه ای، خلیج فارس، نفت خام.

1- مقدمه

نفت خام یکی از مهمترین منابع طبیعی است که سوخت فسیلی عمده منابع صنعتی و ماده اولیه مورد نیاز صنایع پتروشیمی را تأمین می‌کند. نفت خام از ترکیبات بسیاری

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

تشکیل شده است و به چهار گروه ترکیبات اشباع، آروماتیک‌ها، رزین‌ها و آسفالتین‌ها تقسیم‌بندی می‌شود [1]. انتشار و پخش آلودگی‌های نفتی، آثار منفی و پیامدهای مختلفی به دنبال دارد که می‌توان به اثرات نامطلوب زیست‌محیطی، مرگ جانداران دریایی، نامناسب شدن غذاهای دریایی برای مصرف انسانی و کاهش قدرت پرواز پرندگان دریایی اشاره کرد [2].

روش‌های متعددی برای بهبود نشت نفت شامل روش مکانیکی، استفاده از پخش کننده‌ها، فیلترهای جامد، سوزاندن و تجزیه زیستی[1] گسترش یافته است. روش‌های زیستی نسبت به فنون فیزیکی و شیمیایی در حذف نفت مزایایی دارد، به طوری که امکان تجزیه زیستی درونی نفت به وسیله میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌سازد. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط‌های آلوده مؤثرتر، قوی‌تر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر از روش‌های فیزیکوشیمیایی است [3]. دامنه وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها می‌توانند نفت خام را متابولیزه کنند، اما در این بین باکتری‌های تجزیه کننده از اهمیت بیشتری برخوردارند و می‌توانند دامنه وسیعتری از ترکیبات نفتی را تجزیه نمایند [4].

روش تجزیه زیستی، نفت را از مواد مضر آلی به مواد غیر مضر معدنی مانند CO_2 و H_2O تبدیل می‌کند. مطالعه و توسعه روش‌هایی برای تجزیه زیستی نفت اهمیت فراوان در حفاظت از محیط زیست و همچنین از دریا و کنترل آلودگی‌های ناشی از تخلیه نفت در دریا دارد. بطور کلی تجزیه زیستی بعنوان یک روش مناسب جهت تصفیه آلودگی نفتی مورد مطالعه قرار گرفته است [4]. ارزیابی زیستی[2] عبارت است از کاربرد میکروارگانیسم‌ها برای حذف آلودگی‌های محیطی، که به دلیل زیستی و طبیعی بودن فرایند، به آن تجزیه زیستی گویند. در این روش از موجودات زنده به ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان برای پاک‌سازی مواد دفعی مایع و جامد غیر سمّی، آب‌های آلوده، مواد دفعی سمّی زیان‌آور و پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی بکار می‌رود. این میکروارگانیسم‌ها ترکیبات هیدروکربنی را به دی اکسید کربن، بیومس و یا محصولات دیکر تبدیل می‌کنند. کارایی و سرعت فرایند تجزیه هیدروکربن به نوع ترکیبات آلاینده، طبیعت ماده آلوده شده با ترکیبات نفتی، شرایط محیطی و ویژگی‌های جمعیت میکروبی بستگی دارد [5].

موجودات دریایی می‌توانند آلودگی‌ها را از رسوبات بستر، ذرات معلق، منابع غذایی و غیره جذب کنند. بسیاری از مطالعات، ارتباط هم‌زیستی بین صدف دوکفه‌ای و میکروارگانیسم‌ها را نشان داده‌اند که به طور مستقیم به شرایط محیطی بستگی دارد. بر اساس اطلاعات موجود می‌توان نتیجه گرفت که وجود هیدروکربن‌ها، هم فراوانی باکتری‌های داخل آبشش دوکفه‌ای را تحت تأثیر قرار می‌دهد و هم نمونه‌های باکتری را تعیین می‌کند [5]. تحت شرایط خاص همزیستی بین دوکفه‌ای و باکتری، در ساختارهای خاص به نام باکتریوزوم در آبشش[3] یافت می‌شود. فعالیت معلق خواری دوکفه‌ای‌ها فراوانی و تنوع جمعیت میکروبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [6]. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام از دوکفه‌ای‌های منطقه اسکله بهمن درجزیره قشم در استان هرمزگان، بررسی پراکندگی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در بین دوکفه‌ای‌ها و نسبت آن‌ها با باکتری‌های هتروتروف و بررسی تنوع جنس و گونه‌ای در باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام همراه با دو کفه‌ای است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه‌برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام،

[1] Biodegradation
[2] Bioremediation
[3] Gill

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

نمونه‌های آب دریا و دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* در اسکله بهمن قشم جمع آوری قرار گرفتند (شکل 1). نمونه آب دریا از عمق 15 cm و دوکفه‌ای نیز از مناطق ساحلی که احتمال حضور نفت وجود داشت از عمق 10 الی 15 متری به وسیله غواصی در ظروف استریل جمع‌آوری و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در دمای 4˚C تا انجام آنالیزهای بعدی قرار داده شدند. برای تعیین میزان تراکم و تنوع باکتری، ازسطوح درونی دوکفه‌ای‌ها در آزمایشگاه نمونه‌برداری صورت گرفت [7].

شکل 1 نمای مورفولوژیک دوکفه‌ای *Crassostrea gigas*

2-1-1- شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها درنمونه‌های دوکفه‌ای، رسوبات، آب با روش سریال رقت

برای شمارش باکتری‌های همراه در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas*، دوکفه‌ی جانور تحت شرایط استریل با چاقو باز شد. سپس سطح داخلی آن‌ها با استفاده از بافر فسفات 3 بارشستشو داده شد و 1 میلی‌لیتر از این محلول دوکفه‌ای به دست آمده درون لوله‌های آزمایش حاوی 9 میلی‌لیتر آب دریای استریل منتقل گردید [6]. برای نمونه‌های آب نیز به همین ترتیب یک میلی‌لیتر آب دریا به 9 میلی‌لیتر بافر استریل منتقل شد. برای شمارش هتروتروف‌ها در نمونه‌های آب و دوکفه‌ای رقت 10^{-2}، در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و 100 میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های مارین آگار کشت چمنی داده شد. برای شمارش تجزیه کننده‌ها از محیط کشت ONR آگار به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. بدین صورت که 100 میکرولیتر رقت 10^{-1} آب دریا و دوکفه‌ای و بر روی پلیت‌های ONR حاوی 1% نفت کشت سفره‌ای داده شد. پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای30 درجه سانتی‌گراد شمارش کلنی‌ها انجام شد و سپس تعداد کلنی در هر میلی‌لیتر محاسبه شد [8]

2-1-2- شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها در نمونه‌های دوکفه‌ای با روش MPN[1]

ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول دوکفه ای و نمونه آب برداشته و به درون لوله‌های آزمایش حاوی 9 میلی‌لیتر آب دریای استریل منتقل و رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-1} تهیه شد. در میکروپلیت‌های 24 خانه میزان 1500 میکرولیتر محیط مارین براث (مرک) (برای شمارش هتروتروف‌ها) و1500 میکرولیتر محیط ONR حاوی نفت 1٪ (برای شمارش تجزیه کننده‌ها) تحت شرایط استریل ریخته و سپس رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-1} در میکروپلیت‌های 24 خانه تلقیح شد. هر رقت دارای 3 تکرار بود و MPN به صورت 3تایی انجام شد. میکروپلیت‌ها به‌منظور شمارش هتروتروف‌ها به مدت 7 روز و میکروپلیت‌های برای شمارش تجزیه کننده‌ها به مدت 21 روز در دمای 30˚C انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان مثبت برای آزمایش MPN به حساب آمد [10،9].

2-1-3- جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت

برای جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط کشت اختصاصی ONR با 1% نفت خام استفاده شد. از نمونه‌های آب به میزان 5 میلی‌لیتر و محلول دوکفه‌ای 5 میلی‌لیتر به داخل این محیط جهت غنی‌سازی اولیه تلقیح گردید و سپس به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار با دور 160 rpm و دمای 30˚C قرار داده شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

پس از دو پاساژ متوالی کلنی‌ها روی محیط کشت مارین آگار خالص‌سازی شدند. سویه‌های باکتریایی که بیشترین چگالی نوری (OD) در 600 نانومتر داشتند برای شناسایی غربال‌گری شدند. ترکیبات محیط ONR در یک لیتر به شرح زیر است:

محلول اول شامل سدیم کلرید (40 گرم)، سدیم سولفات (3/8 گرم)، سدیم بی کربنات (0/031 گرم)، پتاسیم کلرید (0/72 گرم)، سدیم برمید (0/083گرم)، سدیم فلورید (0/0026 گرم)، سدیم مونوفسفات (0/089 گرم)، اسید بوریک (0/27 گرم)، آمونیوم کلرید (0/27 گرم) و محلول دوم شامل کلسیم کلرید (1/46 گرم)، منیزیم کلرید (11/18 گرم)، استرانسیوم کلرید (0/024 گرم)، آهن کلرید (0/002گرم)، تریس (1/3 گرم) است. اسیدیته محلول در 7/6 تنظیم شد [5].

2-2- شناسایی باکتری‌های جدا شده

2-2-1- شناسایی بیوشیمیایی

برای شناسایی باکتری‌های جدا شده از منابع فوق، از آزمایش‌های اولیه زیر رنگ‌آمیزی گرم، شکل میکروسکوپی، شکل کلنی، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، اکسایش/ تخمیر (O/F)، احیای نیترات، تولید H_2S، تولید اندول و تست TSI استفاده گردید [11].

2-2-2- شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی با تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA توسط پرایمرهای Primer Forward: 5´- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ و Reverse Primer: 5´-TACGYTACCTTGTTACGACTT -3 ´ انجام شد. برنامه PCR برای تکثیر ژن بدین صورت بود: دمای دناتوراسیون 94˚C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها 55˚C به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر 72˚C به مدت 1 دقیقه و تعداد سیکل‌ها 35 می‌باشد. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز 1 درصد بار گذاری شد و سپس باند 1400 bp از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاژ (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست شده و همولوژی آن‌ها بررسی گردید و قرابت بالاتر از 98 درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ گردید [12].

2-3- سنجش حذف نفت خام توسط باکتری‌های جدا شده

2-3-1- روش اسپکتروفتومتری

میزان حذف نفت خام به وسیله حل کردن مقدار نفت باقیمانده محیط کشت در دی کلرو متان و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج 420 نانومتر تعیین شد [13].

100× میزان جذب شاهد / میزان جذب نمونه – میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت خام

2-3-2- روش گاز کروماتوگرافی[1] (GC)

سویه‌ها در محیط کشت ONR حاوی 1 درصد نفت به مدت 10 روز در دمای 30˚C انکوبه شد. پس از دوره انکوباسیون به محیط کشت 50 میلی‌لیتر DCM افزوده و به قیف جداکننده جهت جداسازی فاز آلی از فاز آبی منتقل شد. سپس فاز آلی که حاوی نفت حل شده در DCM بود، درون ارلن ریخته شد و 3 گرم سدیم سولفات جهت جذب آب باقی‌مانده به ارلن اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محتویات ارلن از کاغذ واتمن شماره 1 عبور داده شد و در دمای محیط برای تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM، مجدداً 3 میکرولیتر DCM به یک میکرولیتر نفت باقی‌مانده اضافه شد و توسط دستگاه GC مورد آنالیز قرار گرفت [14]. برنامه GC بدین صورت بود: ستون: (0.32

[1] Gas Chromatography

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

varian capillary column cp- (30 m × mm × 0.1 µm sil5cB، دتکتور: FID، گاز حامل: هلیم، دمای اولیه: C ˚100 برای 1 دقیقه، دمای انتقال: C ˚300، دمای تزریق: C ˚280، دمای نگهداری ستون: C ˚70 مدت 2 دقیقه سپس C ˚290 به مدت 7 دقیقه، دمای نهایی: C ˚290 و جریان عبوری 3 میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پیک‌های حاصل از GC با شاهد مقایسه شد و درصد تجزیه برای هر سویه محاسبه گردید.

3- نتایج

3-1- کمیت باکتری‌های هتروتروف‌ها و تجزیه کننده در دوکفه‌ای و آب دریا

تراکم باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده نفت خام در نمونه‌های دوکفه‌ای و آب دریا (محیط پیرامون) با دو روش سریال رقت و شمارش حداکثر احتمالی تعیین گردید. نتایج حاصله در جدول 1 آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، نمونه دوکفه‌ای تعداد باکتری هتروتروف و تجزیه کننده بیشتری در مقایسه نمونه آب اطراف دارد. این امر بدین معنی است که تراکم باکتری‌ها در دوکفه‌ای از محیط پیرامون بالاتر است.

3-2- جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام

در این تحقیق در مجموع 11 باکتری تجزیه کننده نفت از نمونه‌های دوکفه ای و آب جمع‌آوری شده از ناحیه اسکله بهمن قشم جداسازی شد. تعداد 8 سویه مربوط به نمونه دوکفه‌ای و 3 سویه مربوط به نمونه آب دریا بود. سویه‌های جداسازی شده در محیط ONR به همراه نفت به عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. تعداد 7 سویه که قادر به رشد بالاتر در این محیط بودند، به عنوان سویه‌های برتر تجزیه کننده نفت برای شناسایی بیوشیمیایی انتخاب شدند. در جدول 2 خصوصیات کلی این 11 باکتری جداسازی شده امده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود همه این باکتری‌ها گرم منفی هستند و اکثر آنها رشد قابل ملاحظه‌ای در محیط حاوی نفت نشان می‌دهند.

3-3- شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام

برای بررسی برخی از ویژگی‌های باکتری‌های جداسازی شده و مشخص نمودن باکتری‌های که دارای الگوی بیوشیمیایی مشابه هستند، برخی از تست‌های شناسایی اولیه انجام شد. نتایج حاصله در جدول 3 امده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود اکثر باکتری‌ها اکسیداز و کاتالاز مثبت هستند.

3-4- شناسایی مولکولی دو سویه برتر تجزیه کننده

از 7 باکتری غربالگری شده 2 باکتری در تجزیه نفت خام نسبت به بقیه سویه‌ها قابلیت بالاتری نشان دادند و همچنین الگوی بیوشیمیایی متفاوتی داشتند. این دو سویه (BA 1-3 و BA 1-4-1) با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rRNA بطور مولکولی شناسایی شدند.

جدول 1 کمیت باکتری‌های هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها با روش سریال رقت و MPN

نمونه	(CFU·g−1) هتروتروف	(CFU·g−1) تجزیه کننده	MPN باکتری هتروتروف	MPN باکتری تجزیه کننده
دوکفه‌ای (BA 1)	$3/16\times10^{5}$	$1/3\times10^{3}$	$4/6\times10^{5}$	$5/1\times10^{4}$
آب (BA 2)	$2/8\times10^{3}$	1×10^{1}	$3/3\times10^{5}$	$2/3\times10^{3}$

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

جدول 2 خصوصیات کلی باکتری‌های جدا شده

سویه	منطقه جداسازی شده	شکل باکتری و واکنش گرم	خصوصیات کلنی	تست کیفی	جذب نوری (OD_{600})
BA 1-1-1	دوکفه‌ای	میله‌ای، گرم منفی	سفید، درشت، موکوئیدی	++++	0/90
BA 1-1-2	دوکفه‌ای	میله‌ای، گرم منفی	سفید، ریز	++	0/50
BA 1-1-3	دوکفه‌ای	میله‌ای، گرم منفی	سفید، درشت، موکوئیدی	+	0/53
BA 1-1	دوکفه‌ای	میله‌ای، گرم منفی	نارنجی، درشت، موکوئیدی	++++	0/90
BA 1-2	دوکفه‌ای	کوکوباسیل، گرم منفی	نارنجی، درشت، موکوئیدی	+++	1/72
BA 1-3	دوکفه‌ای	کوکوباسیل، گرم منفی	نارنجی، درشت، موکوئیدی	++++	1/95
BA 1-4-1	دوکفه‌ای	میله‌ای بلند، گرم منفی	سفید، درشت	++	1/50
BA 1-4-2	دوکفه‌ای	میله‌ای بلند، گرم منفی	سفید، ریز	+	0/79
BA 2-2	آب	کوکوباسیل، گرم منفی	سفید، ریز	+	0/75
BA 2-1-1	آب	کوکوباسیل، گرم منفی	سفید، درشت	-	0/30
BA 2-3	آب	کوکوباسیل، گرم منفی	سفید، متوسط	-	0/77

جدول 3 خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی تجزیه کننده نفت خام

نام سویه	O/F	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	تولید H_2S	تولید ایندول	احیاء نیترات	تست TSI
BA 1-1	-/-	+	+	+	+	-	+	قلیا/ قلیا
BA 1-1-1	-/-	-	+	-	-	-	+	قلیا/ قلیا
BA 1-2	-/-	+	-	+	+	-	-	قلیا/ اسید
BA 1-3	-/-	+	+	+	+	-	+	قلیا/ قلیا
BA 1-1-2	-/-	+	+	-	-	-	-	قلیا/ قلیا
BA 1-4-1	+/-	+	+	-	-	-	-	اسید/ قلیا
BA 2-2	-/-	-	+	-	-	-	+	قلیا/ قلیا

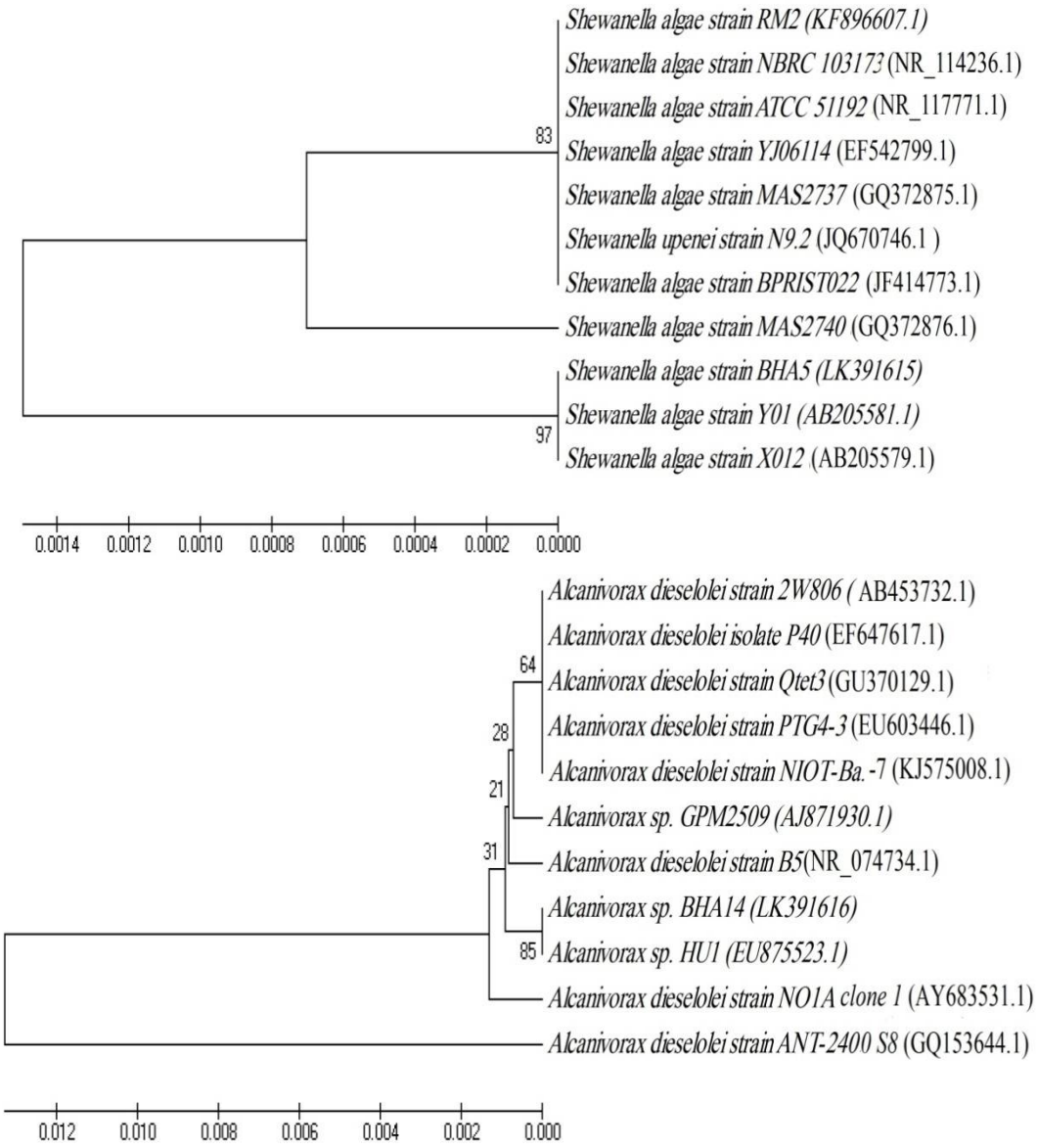
محصول PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و برای تعیین توالی فرستاده شد. توالی‌های حاصل در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از 98%) به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که سویه BA 1-3 متعلق به جنس *Shewanella algae* و سویه BA 1-4-1 به جنس *Alcanivorax sp.* تعلق دارد. این دو سویه با شماره‌های دستیابی: LK391615 و LK391616 در پایگاه جهانی ژنی NCBI ثبت شده‌اند. شکل 2 نیز درخت فیلوژنی این دو باکتری و میزان قرابت آنها را با باکتری‌های دیگری که قبلاً جداسازی شده‌اند را نشان می‌دهد.

3-5- میزان حذف نفت خام توسط سویه‌های برتر

دوسویه برتر تجزیه کننده بر روی غلظت یک درصد نفت خام رشد داده شدند. پس از 10 روز میزان حذف نفت خام به وسیله سویه‌ها به روش اسپکتروفتومتری و گاز کروماتوگرافی سنجش شد. نتایج حاصل در جدول 4 آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود سویه BA

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

1-4-1 با تجزیه نزدیک به 80 درصد نفت خام بهترین سویه تجزیه کننده در این تحقیق گزارش می‌شود. طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل از تجزیه نفت توسط این دو سویه نیز در شکل 3 نشان داده شده است.

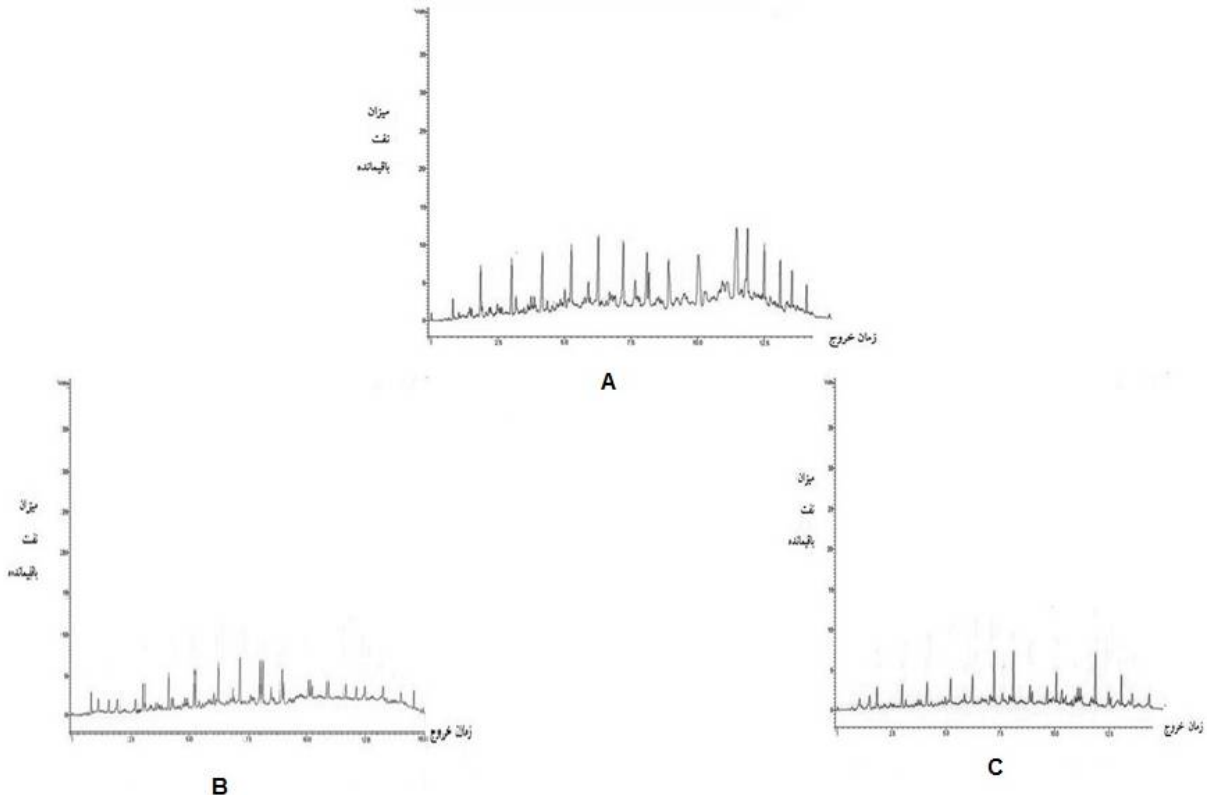


شکل 2 درخت فیلوژنی دو سویه برتر تجزیه کننده نفت خام

جدول 4 میزان تجزیه نفت خام توسط دو سویه برتر

سویه	درصد تجزیه محاسبه شده با روش اسپکتروفتومتری	درصد تجزیه محاسبه شده با روش GC
Shewanella algae Strain BA 1-3	48/4	56/63
Alcanivorax sp. Strain BA 1-4-1	68/31	79/78

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]



شکل 3 طیف‌های گاز کروماتوگرافی تجزیه نفت خام توسط دو سویه برتر (A): شاهد نفت بدون باکتری (B): سویه BA 1-3 و (C) سویه BA 1-4-1

همان‌طور که در شکل 3 دیده می‌شود، طیف‌های گاز کروماتوگرافی سویه‌ها نسبت به شاهد کمتر شده که تأیید کننده تجزیه و حذف ترکیبات نفتی است.

4- بحث

مطالعات بسیاری بر روی جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده نفت از محیط‌های گوناگون اعم از خشکی و دریایی انجام شده است. بطور نمونه Hassanshahian و همکاران 28 سویه باکتریایی و دو سویه مخمری تجزیه کننده نفت از محیط‌های دریایی ایران شامل خلیج فارس و دریای خزر شرح دادند. سویه‌های باکتریایی جدا شده به جنس‌های *Acinetobacter, Rhodococcus, Pseudomonas, Microbacterium, Halomonas, Alcanivorax, Marinobacter* تعلق داشتند و سویه‌های مخمری جدا شده به جنس *Yarrowia* مربوط شدند. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که باکتری‌های تجزیه کننده نفت در محیط زیست دریایی ایران از تنوع بسیار بالا با توانایی تجزیه متفاوت برخوردار است [15]. در تحقیق دیگری Gutierrez و همکاران جنس *Psudoalteromonas* (از آب‌های عمیق Horizon)، Al-Awadhi و همکاران جنس‌های *Micrococcus* و Vibrio (از آب‌های خلیج فارس) جداسازی نمودند [17،16].

در سال‌های اخیر علاقه زیادی به مطالعه بر روی موجودات دریایی که در اکوسیستم دریایی آلوده به مواد نفتی زندگی می‌کنند، ایجاد شده است. در این میان دوکفه ای‌ها به دلیل تغذیه و زندگی در رسوبات تازه ته‌نشین یافته و در نتیجه تماس مستقیم با مواد آلوده آب و همچنین فعالیت معلق خواری با باکتری‌های جمع شده در رسوبات و آب از اعضای مهم اکوسیستم دریایی هستند

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

که نقش مهمی در فرایند پاک‌سازی ایفا می‌کنند [15]. برخی مطالعات نشان داده که دوکفه‌ای‌ها زیستگاه‌های طبیعی برای برخی از گونه‌های باکتریایی است. تفاوت‌های کمّی و کیفی در میکروب‌های غالب دوکفه‌ای به تفاوت ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مناطقی که این صدف‌ها جمع آوری شدند، مربوط می‌شوند [6].

Prieur و همکاران گزارش دادند که فراوانی *Photobacterium* و *Vibrio* در *C. gigas* بیشتر از محیط اطراف است. Cappello و همکاران برای اولین بار روی فراوانی باکتری‌های آبشش دوکفه‌ای‌های معلق‌خوار در محیط‌های آلوده و غیر آلوده مطالعاتی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که تعداد باکتری‌های تجزیه کننده نفت در مناطق آلوده نسبت به مناطق غیر آلوده بسیار بالا و فراوانی باکتری‌های هتروتروف در هر دو محیط تقریباً ثابت است [18،19].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تراکم باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده، در دوکفه‌ای *Crassostrea gigas* نسبت به محیط اطراف بیشتر است که با نتایج تحقیقات قبلی مطابقت دارد. همچنین 11 سویه تجزیه کننده نفت از نمونه‌های دوکفه‌ای و آب ناحیه اسکله بهمن قشم جداسازی شد که نهایتاً با سنجش‌های غربال‌گری از 11 سویه تجزیه کننده نفت، 2 سویه باکتریایی انتخاب شد و بعد از شناسایی مولکولی مشخص شد که مربوط به جنس *Shewanella* و *Alcanivorax* است.

از روش‌های گوناگونی برای بررسی میزان تجزیه نفت خام توسط باکتری‌های تجزیه کننده استفاده شده است. Rahman و همکاران از روش جذب اسپکتروفتومتری در 420 نانومتر برای تخمین میزان تجزیه استفاده کردند. این محققان 130 سویه تجزیه کننده نفت را از خاک‌های آلوده به نفت در انگلستان جداسازی نمودند که در بین آن‌ها جنس *Pseudomonas* قادر به حذف 66 درصد از نفت بود. سایر جنس‌های جدا شده نیز نیمی از نفت خام را هنگامی‌که روی غلظت 1 درصد نفت رشد داده شده بودند، حذف می‌کردند [13].

Wang و همکاران با روش کروماتوگرافی گازی (GC) میزان تجزیه نفت در سه سویه باکتری *Bacillus* سنجش نمودند. اغلب محققان از روش کروماتوگرافی گازی و اندازه‌گیری طیف‌های حاصل به عنوان بهترین و مطمئن‌ترین روش بررسی حذف نفت خام تأکید دارند و در بیشتر مقالات از این روش استفاده شده است [14]

در تحقیق حاضر از دو روش ذکر شده برای سنجش تجزیه نفت خام استفاده شد، که نتایج حاصل از این روش‌ها همخوانی دارند، به طوری که *Alcanivorax sp* دارای حذف بالاتری نسبت به بقیه باکتری‌ها بود و به طور مشابه اکثر پیک‌های GC نیز در طیف حاصل کاهش داشتند.

5- نتیجه‌گیری

این مطالعه برای اولین بار به جداسازی باکتری‌های همراه تجزیه کننده دوکفه‌ای‌های خلیج فارس پرداخته است. در این میان سویه‌های باکتریایی *Shewanella algae* و *Alcanivorax sp* اولین بار از نمونه دوکفه‌ای به عنوان باکتری همراه گزارش شده‌اند. در این مطالعه باکتری‌های تجزیه کننده نفت همراه با دوکفه‌ای‌ها و محیط پیرامون آن جداسازی شدند. ضمن شناسایی این باکتری‌ها، تراکم وتنوع باکتری‌ها در نمونه‌های دوکفه‌ای و محیط اطراف و قابلیت تجزیه نفت توسط آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری‌های موجود در خلیج فارس از تنوع زیاد با توان تجزیه نفت بالا برخوردار هستند و می‌توان از آن‌ها برای پاک‌سازی مناطق دریایی آلوده به نفت استفاده کرد.

6- منابع

[1] Speight, J.G. (1999) *The chemistry and technology of petroleum*. Marcel Dekker New

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]

York, 3rd Edition.
[2] Todd, P.A., Ong, X., and Chou, L.M. (2010) Impacts of pollution on marine life in Southeast Asia. *Biodivers. Conserv.* 19(4), 1063-1082.
[3] Hanson, K.G., Anuranjini, N., Madhavi, K., and Anjana, J.D. (1997) Bioremediation of crude oil contamination with Acinetobacter.sp A3. *Curr. Microbiol*. 35(3), 191-193.
[4] Hasanshahian, M., and Emtiazi, G. (2008) Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *Int. Biodegrad.* 62, 170-178.
[5] Hassanshahian, M., Emtiazi, G., and Cappello, S. (2012) Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 7-12.
[6] Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., and Stabili, L. (2009) Culturable heterotrophic bacteria in sea water and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). *Environ. Monitor. Assess.* 149, 465–475.
[7] Subarna, R., Dipak, H., Debabrata, B., Dipa, B., and Ranajit, K. (2002) Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World J Microb Biot.* 18, 575–581.
[8] Balba, M.T., Al-Awadhi, N., and Al-Daher, R. (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods.* 32(2), 155–164.
[9] Wrenn, B.A., and Venosa, A.D. (1996) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. *J Microbiol*. 42(3), 252–258.
[10] Fuchsluger, C., Preims, M., and Fritz, I. (2010) Automated measurement and quantification of heterotrophic bacteria in water samples based on the MPN method. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 38, 241-247.
[11] Holt, S.G., Kriey, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T and Williams, S.T. (1998) *Bergy's Manual of Determinative for Bacteriology*. Williams and Wilkins, New York.
[12] Yakimov, M.M., Timmis, K.N and Golyshin, P.N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curre. Opin. Biotechnol*. 18(3), 257-266.
[13] Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., and Banat, I.M. 2004. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour Technol*. 85, 257-261.
[14] Wang, L., Tang, Y., Wang, Sh., Liu, R., Liu, M.Z., Zhang, Y., Liang, F.L and Feng, L. (2006) Isolation and characterization of a novel thermophilic Bacillus strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles.* 10, 347–356.
[15] Distel, D.L. (1998) Evolution of chemoautotrophic endo symbiosis in bivalves: Bivalve-bacteria chemosymbiosis are phylogenetically diverse but morphologically similar. *Biol. Sci.* 48, 277-286.
[16] Al-Awadhi, H., Sdashti, N. (2012) waters of the Arabian Gulf. Int. *Biodeterior. Biodeg.* 69, 10–16.
[17] Gutierrez, T., Singleton, D., Berry, D., Yang, T., D.Aitken, M., and Teske, A. (2013) Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *ISME J.* 7, 2091-2104.
[18] Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J.L., Plusguellec, A and Vigneulle, M. (1990) Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev*. 28, 277-352.
[19] Cappello, S., Russo, D., Santisi, S., and Calogero, R. (2011) Presence of hydrocarbon-degrading bacteria in the gills of mussel Mytilusgallo provincialis in a contaminated environment: a mesoscale simulation study. *Chem. Ecol*. 3, 1–14.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-26]