

ارزیابی باکتری های تجزیه کننده نفت و توانایی آن ها در رفع آلودگی های زیست محیطی وابسته

سعید حیدری کشنل^۱، ایمان رهنما فلاورجانی^۲، علی رضا چکشیان خراسانی^{۳*}، منصور مشرقی^۳، مریم ابراهیمی^۱، سهیلا یغمایی^۱، احمد اعتدالی^۴، حشمت الله نور مرادی^۵، سمیه سلیمانی^۶

- (۱) مرکز تحقیقات پرتوئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
- (۲) دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
- (۳) پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
- (۴) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- (۵) گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- (۶) گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد همدان

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۱

چکیده

مقدمه: تجزیه زیستی نفت کوره سنگین (مازوت) به وسیله میکرووارگانیسم های مستعد بومی یکی از زمینه های جدید از فناوری زیستی در صنایع نفت است. سازگاری با محیط و کم هزینه بودن این روش روز آن را گسترش داده است. جداسازی و شناسایی باکتری های نفت خوار می تواند برای تجزیه کردن نفت کوره سنگین نیز موثر باشد.

مواد و روش ها: نمونه برداری از منابع خاکی و آبی آلوده به ترکیبات نفتی انجام شد. نمونه ها بر روی محیط های کشت اختصاصی رشد داده شد تا میکرووارگانیسم های مستعد جداسازی شوند. پس از جداسازی، توانایی تجزیه کنندگی آن ها بر روی مازوت بررسی شد. بهترین میکرووارگانیسم انتخاب و شناسایی شد. سپس تجزیه مازوت، در بسترهایی با مازوت تثبیت شده و شناور، توسط آن سویه بررسی گردید.

یافته های پژوهش: سویه جدید Enterobacter cloacae (BBRC10061) برای تجزیه زیستی مازوت از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی شهر مشهد جداسازی و شناسایی شد. در شرایط هوایی ۱۳ درصد از مازوت (۱ درصد حجمی) موجود در محیط معدنی، در مدت ۱۰ روز، توسط BBRC10061 تجزیه گردید. بررسی تثبیت و شناور سازی مازوت و به کارگیری مخلوط میکروبی نشان داد که شناور سازی مازوت و جلوگیری از چسبیدن آن به محیط زیست واکنشگاه سبب افزایش بازده فرایند می شود و مخلوط میکروبی نیز قادر به افزایش تجزیه مازوت به صورت محسوس نیست.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل در این مطالعه نشان داده است که سویه BBRC10061 می تواند به عنوان تجزیه کننده مناسب هیدروکربن های سنگین و ترکیبات نفتی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: جداسازی، مازوت، تجزیه زیستی، هیدروکربن های نفتی، Enterobacter cloacae

* نویسنده مسئول: دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

Email: alireza.chackoshian@gmail.com

مقدمه

مواد و روش ها

ماده اصلی استفاده شده در این پژوهش مازوت است که از شرکت توزیع و پخش فرآورده های نفتی ایران با نام تجاری نفت کوره ۳۸۰ تهییه شده است. کلروفرم با خلوص ۹۹/۶ درصد برای استخراج و رقیق سازی مازوت از شرکت شیمی پژوهش آسیا تهییه شده است. کلسیم کلرید(CaCl₂), آمونیوم سولفات(NH₄)₂SO₄), آهن(II) سولفات.۷ آبه(FeSO₄.7H₂O), منیزیم سولفات.۷ آبه(MgSO₄.7H₂O), پتاسیم دی هیدروژن فسفات(KH₂PO₄) و پتاسیم هیدروژن فسفات(K₂HPO₄) برای تهییه محیط معدنی از شرکت NB مرک آلمان خریداری شده است. دو محیط کشت Scharlau و PDB و نیز ماده آگارآگار از شرکت خریداری شده اند. کیت استخراج DNA از شرکت Genet Bio و کیت PCR از شرکت Bioneer شده است. پرایمرهای 5'-AGA GTT TGA (27F و 5'-GGT (1492R) و (TCC TGG CTC AG-3' (TAC CTT GTT ACG ACT T-3' از شرکت تکاپو زیست تهران خریداری شده است.

نمونه برداری از محیط: از دو منبع خاکی و یک منبع آبی نمونه برداری به عمل آمد. یکی از منابع خاکی، خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد بوده است که احتمال آلوده بودن به گازوئیل در آن وجود داشت. دیگری خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی واقع در شهر مشهد بوده است که این خاک سالیان زیادی است تحت جریان فاضلاب نفتی قرار دارد. منبع آبی استفاده شده نیز مخزن قدیمی از کار افتاده گازوئیل بوده است که در آن گازوئیل به همراه آب مخلوط شده و همراه با لجن ته مخزن نمونه آبی آلوده محسوب می شود. نمونه خاک آلوده به فاضلاب اتوبوسرانی از سطح خاک تا عمق ۱۰ سانتی متری خاک گرفته شده است. نمونه خاک نزدیک مخزن گازوئیل نیز از خاک های سطحی بوده است. نمونه مخزن گازوئیل نیز شامل مخلوط گازوئیل و آب به همراه لجن ته مخزن بوده است. تمامی وسایل و ظروف مانند قاشق یا بیلچه که در این عملیات استفاده

مازوت دارای هیدروکربن های سنگین مانند آسفالتن، رزین ها، آلکان های بلند زنجیر، سیکلولالکان ها و آروماتیک های چند حلقه ای است،(۱،۲). مازوت بر اساس ویسکوزیته سینماتیک انواع مختلفی دارد،(۳). روش های زیستی به عنوان روش های موثر و مقرون به صرفه توصیه شده است. مزیت این روش نسبت به سایر روش های فیزیکی و شیمیابی، سادگی فرایند و هزینه کمتر آن است،(۴-۷). استفاده از میکرووارگانیسم های بومی هر منطقه در تجزیه مواد مهم است،(۸). عوامل متعددی بر روی میزان تجزیه زیستی ترکیبات نفتی تاثیر می گذارند،(۹). درک عوامل و شرایط تاثیرگذار دارای اهمیت خاصی است،(۱۰). متناسب با نوع ماده مورد نظر و فرایندی که باید انجام شود می توان میکرووارگانیسم خاصی را از محیطی جدا کرد،(۱۱). در ایران میکرووارگانیسم های بومی توانمند مانند *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Provedenica stuartii*, *stutzeri*, *Micrococcus* sp., *Bacillus*, *Cereus*, sp., *Serratia* sp., *Enterobacter cloacae* مختلف آلوده به ترکیبات نفتی مانند منابع خاکی و آبی جداسازی شده و برای تجزیه هیدروکربن های مختلف به کار گرفته شده اند؛ در حالی که تجزیه زیستی مازوت در ایران انجام نشده است.(۱۲-۱۷)

هدف از این پژوهش، تجزیه ترکیبات نفتی مازوت از طریق شناسایی و به کارگیری میکرووارگانیسم های بومی توانمند موجود در طبیعت و بررسی تاثیر شرایط فرایندی مختلف بر آن بوده است. برای تحقیق این اهداف از منابع طبیعی آلوده به ترکیبات مختلف نفتی مانند آب و خاک آلوده به ترکیبات نفتی در مشهد نمونه برداری گردید. طی آزمایش های مختلف میکرووارگانیسم های توانمند بومی جداسازی و از طریق 16S rDNA شناسایی اولیه و سپس با کمک روش بررسی شدند. در ادامه تاثیر تجزیه کنندگی آن ها بر روی مازوت در شرایط مختلف بررسی گردید.

انتخاب شده است تا امکان رشد برای قارچ ها که سرعت رشد کمتری نسبت به باکتری ها دارند نیز فراهم شود.

خالص سازی میکروارگانیسم ها: پلیت ها بررسی شدند و کلونی ها یا مناطقی که میکروب ها تجمع داشته و احتمال متمایز بودن آن ها وجود داشت، تحت شرایط استریل در زیر هود میکروبی به یک پلیت تازه منتقل شدند. نوع محیط کشت جامد جدید باید با محیط قبلی یکسان باشد؛ تجمعاتی که روی NA رشد نموده بر روی NA تازه و تجمعاتی که روی PDA رشد کرده بر روی PDA جدید انتقال داده شده اند. تحت شرایط ذکر شده، کشت خطی ۳ بار تکرار گردید و هر بار به مدت ۲ روز در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد گرمگذاری شد. پس از به دست آمدن تک کلونی های خالص میکروبی از محیط های کشت جامد، مرحله خالص سازی به اتمام رسید. در پایان این مرحله برای نگهداری میکروارگانیسم های خالص شده، محیط پلیت ها برای جلوگیری از خشک شدن و نفوذ هوا ایزوله شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

شناسایی مقدماتی میکروبی: برای شناسایی اولیه میکروارگانیسم ها ابتدا با مشاهده چشمی کلونی ها، رنگ، اندازه و شکل تقریبی آن ها بررسی گردید. در مرحله بعد و با کمک میکروسکوپ نوری (بزرگ نمایی ۱۰۰۰) شکل دقیق میکروارگانیسم ها مشاهده گردید. سپس روش رنگ آمیزی گرم به کار گرفته شد تا گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری ها بررسی شود.

شناسایی میکروبی با روش ۱۶S rDNA: این مرحله پنج بخش استخراج DNA، تکثیر قطعه PCR، تعیین توالی قطعه تکثیر شده و نهایتاً شناسایی کامل میکروارگانیسم را شامل می شود. برای استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته باکتری استفاده شد و مراحل استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA انجام شد. پس از استخراج DNA، در مرحله تکثیر قطعه ۱۶S rDNA توسط PCR از پرایمرهای عمومی ۵'-(-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

شده کاملاً استریل بوده اند.

جداسازی میکروارگانیسم ها: برای جداسازی میکروارگانیسم ها از منابع نمونه گیری شده، ابتدا محیط معدنی مناسب برای رشد میکروارگانیسم ها با ترکیب $0.1\text{ g}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1\text{ g}\text{CaCl}_2$, $0.1\text{ g}\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1\text{ g}\text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.5\text{ g}\text{(NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.1\text{ g}\text{K}_2\text{HPO}_4$ در یک لیتر آب مقطر ساخته شده است. میزان pH محیط روی ۶/۸ تنظیم شد. از این محیط در ۳ ارلن ۲۵۰ ml و در هر کدام حجم ۱۰۰ml ریخته، سر گردیده اند. از هر نمونه خاک ابتدا ۵ گرم خاک در یک بشر ریخته و پس از اضافه شدن ۱۰۰ml آب مقطر عاری از آلودگی به هر نمونه، این سوسپانسیون ها توسط شیکر در دمای آزمایشگاه و در ۲۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه به طور کامل مخلوط شده اند. پس از آن نیز با ۱۰۰ml آب مقطر عاری از آلودگی در همان شرایط ذکر شده به طور کامل مخلوط شده است. پس از اختلاط کامل، هر ۳ سوسپانسیون برای ته نشینی ذرات مزاحم به مدت ۱۰ دقیقه ساکن شدند و پس از آن از محیط مایع هر یک از سوسپانسیون ها به میزان ۱ml برداشته و در شرایط کاملاً استریل به محیط های معدنی اضافه می شود. هر ارلن برای یک نمونه آمده می شود و پس از اضافه شدن ۱ گرم مازوت به هر ارلن، هر ۳ ارلن به مدت ۵ روز در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد و دور ۱۶۰rpm قرار می گیرند. پس از ۵ روز، از هر ارلن ۱ ml نمونه برداشته و روی سطح محیط کشت جامد NA و PDA منتقل می شود. برای هر ارلن یک محیط NA و یک محیط PDA اختصاص داده شد. در واقع با این کار، این امکان فراهم شد تا میکروارگانیسم های سازگار با محیط کشت اختصاصی خود قابلیت رشد داشته باشند. محیط کشت جامد NA برای رشد باکتری ها و PDA برای رشد قارچ ها فراهم شد. پس از انتقال محیط هر ارلن بر روی محیط های کشت جامد، آن ها در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ روز قرار گرفتند. زمان طوری

پایه دار سانتریفیوژ با حجم ۵۰ ml توزیع شده اند. pH محیط معدنی روی ۶/۸ تنظیم شده و با افزودن ۱/۲۰۰۰ ppm گرم در ۵۰ ml مازوت به زیست واکنشگاه، محیط فرایند توسط اتوکلاو استریل شد. سامانه بستر ثابت به دو شکل مازوت شناور و مازوت تشییت شده تمیزی گردید. برای تمیزی سامانه مازوت تشییت شده، پیش از افزودن محیط معدنی به زیست واکنشگاه، مازوت را روی دیواره زیست واکنشگاه توزیع کرده تا در تمام ارتفاع ستون زیست واکنشگاه پخش شود و به دیواره بچسبد ولی برای مازوت شناور پس از اضافه شدن محیط معدنی، مازوت به زیست واکنشگاه افزوده شد. سپس زیر هود و در شرایط کاملاً عاری از میکروب به محیط های استریل شده میکرووارگانیسم مورد نظر تلقیح شد به طوری که OD600 محیط معدنی به میزان ۴/۰ افزایش یافت. پس از آماده سازی زیست واکنشگاه ها به تعداد مطلوب، سامانه تولید دمای لازم برای انجام عملیات تجزیه مازوت در زیست واکنشگاه ها توسط انکوباتور و با تنظیم آن روی دمای ۳۳ درجه سانتی گراد فراهم شد. به دلیل انتخاب سامانه با بستر ثابت نیازی به شیکر نبوده و با قرار دادن زیست واکنشگاه ها در انکوباتور فرایند زیست تخریب مازوت در شرایط کاملاً ساکن آغاز گردید. شاهد شامل تمام اجزا به جز مازوت بوده است.

برای اندازه گیری توانمندی میکرووارگانیسم های جدا شده در تجزیه مازوت از شیکر انکوباتور در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد و دور ۱۶۰ rpm استفاده شده است. محیط معدنی زیست واکنشگاه ها نیز مانند آن چه در زیست واکنشگاه های بستر ثابت بوده، آماده گردید و با افزودن ۱۰۰۰۰ ppm گرم در ۵۰ ml مازوت به محیط معدنی و هم چنین با تلقیح هر یک از میکرووارگانیسم های خالص سازی شده (OD600=0.04) به زیست واکنشگاه ها، آن ها در شیکر انکوباتور تنظیم شده به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند.

سنجه دستگاهی: برای سنجش میزان مازوت از کدورت سنجی با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل S2000 UV/VIS ساخت شرکت WPA استفاده شد. به هر

۵'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT 1492R (T-3') استفاده شد. طول قطعه قابل تکثیر در حدود ۱۵۰۰ bp تخمین زده شد. محیط آماده شده برای PCR به حجم ۱۲۵ μl بوده و از جدول شماره ۱ پیروی می کند.

پس از آماده سازی محلول تکثیر و کنترل منفی که شامل تمام اجزا به جز DNA الگو بود و قرار دادن آن ها در دستگاه PCR، واکنش های تکثیر قطعه ۱۶S rDNA با برنامه زیر انجام گرفت: - واکنش واسرشت اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه طی یک چرخه. ۳۵- ۳۵ چرخه عبارتند از: واسرشت DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۵۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها به رشته های DNA در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر و افزایش طول رشته های DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ دقیقه و ۴۰ ثانیه.

- افزایش طول نهایی رشته تکثیر شده در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه. - خنک کردن محلول تا دمای ۱۵ درجه سانتی گراد.

پس از آماده شدن محصول PCR، برای جداسازی محصول و تعیین باندهای ممکن در آن از الکتروفورز با ژل آگاروز ۱ درصد و بافر ۱ درصد استفاده شد. پس از مشاهده باند، محصول PCR از روی ژل بریده شد و پس از تخلیص تعیین توالی شد. با بررسی نتیجه تعیین توالی در بانک اطلاعات Blast Local Alignment Search (BLAST Tool)، و با توجه به شناسایی مقدماتی میکرووارگانیسم، نوع و سویه باکتری شناسایی شد.

آماده سازی زیست واکنشگاه: محیط رشد میکرووارگانیسم ها برای تجزیه مازوت شناور و تشییت شده، تشکیل شده از ترکیب ۱/۰ گرم CaCl₂, ۰/۰۱ گرم MgSO₄.7H₂O, ۰/۰۱ گرم FeSO₄.7H₂O, ۱ گرم (NH₄)₂SO₄, ۰/۵ گرم K₂HPO₄ و ۰/۵ گرم KH₂PO₄ مقطر که در زیست واکنشگاه های لوله ای (لوله های

بوده اند. نوع دیواره سلولی باکتری های خالص شده توسط رنگ آمیزی گرم و سپس مشاهده با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. شکل ظاهری کلی ها و باکتری ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاصل از این بررسی ها در جدول شماره ۲ آورده شده است.

باکتری NO4 با روش 16S rDNA شناسایی شد. این باکتری سویه جدیدی از باکتری E.cloacae است. این باکتری شباهتی در حدود ۹۷ درصد با باکتری E.cloacae(ATCC 13047) دارد ولی به دلیل این که کاملاً انطباق ندارد سویه ای جدید از این باکتری Gamma محسوب می شود. این باکتری در گروه Enteroba- Proteobacteria، متعلق به خانواده Enterobacter و از جنس Enterobacteriaceae کارایی هر ۱۲ باکتری در تجزیه زیستی مازوت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. همان گونه که شکل شماره ۱ نشان می دهد تنها ۴ باکتری قابلیت تجزیه زیستی مازوت را داشته اند. در این میان باکتری NO4 که از خاک آلوده به فاضلاب نفتی جاذشده قابلیت بیشتری از خود نشان داده و با تجزیه ۱۳ درصدی مازوت(1300 ppm از 10000 ppm) طی ۱۰ روز بهترین عملکرد را در این مطالعه داشته است. باکتری PG1 جدا شده از خاک محل مخزن گازوئیل با ۴ درصد تجزیه کنندگی در میان ۴ باکتری موفق، ضعیف ترین عملکرد را داشته است. دیگر باکتری ها نتوانسته اند رشد کنند و تنها حالت انفعالی داشته و خود را زنده نگه داشته اند و به همین علت مازوت نیز تجزیه نشده است. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین میزان تجزیه مازوت ۱۳ درصد و کمترین آن صفر درصد بوده است. از میان باکتری های تجزیه کننده، باکتری هایی که از منبع خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیلی جدا شده اند توانایی بیشتری برای تجزیه مازوت داشته اند؛ زیرا محیط زیست آن ها کاملاً مشابه با محیط حاوی مازوت بوده و مجبور به استفاده از هیدروکربن های نفتی مختلف برای تأمین منبع کربن بوده اند.

زیست واکنشگاه ۳ ml کلروفرم اضافه و آن قدر زیست واکنشگاه به هم زدن می شود تا کل مازوت در کلروفرم حل شود. پس از حل شدن کامل مازوت، فاز آلی شامل مازوت و کلروفرم در زیر قرار گرفته و محیطمعدنی در بخش بالایی زیست واکنشگاه قرار می گیرد. بخش معدنی که عاری از مازوت و ترکیبات آلی حاصل از تجزیه مازوت است را خالی کرده و فاز آلی جداسازی می شود. اکنون با نمونه گیری از فاز آلی و رقیق سازی نمونه تا حد امکان با حلال کلروفرم و خواندن جذب آن در طول موج $\lambda=450\text{nm}$ در مقابل شاهد با دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب نمونه اصلی به دست می آید. غلظت مازوت نمونه اصلی نیز بر اساس نمودار استاندارد غلظت-جذب مازوت حاصل می شود. برای سنجش میزان میکروارگانیسم های موجود از زیست واکنشگاه مورد نظر، نمونه گیری کرده و جذب نمونه در طول موج $\lambda=600\text{nm}$ در مقابل شاهد خوانده شد و عدد نشان داده شده توسط اسپکتروفوتومتر به عنوان دانسیته نوری(OD600) ثبت گردید.

یافته های پژوهش

میکروارگانیسم های جدا شده، پس از انجام کشت های خطی بر روی محیط های کشت جامد به صورت ۱۲ میکروارگانیسم خالص سازی شدند. در این میان ۴ میکروارگانیسم NO1، NO2، NO3 و NO4 و ۲ رشد کرده بر روی محیط کشت NA و PDA میکروارگانیسم PO1 و PO2 رشد کرده بر روی از خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی واقع در شهر مشهد به دست آمده اند. ۳ میکروارگانیسم NG1، NG2 و NG3 کشت داده شده بر روی NA و ۱ میکروارگانیسم PG1 کشت داده شده روی PDA از خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد حاصل شده اند. از لجن و گازوئیل مخلوط به آب در مخزن گازوئیل نیز میکروارگانیسم NL1 رشد یافته روی NA و میکروارگانیسم PL2 کشت شده بر روی PDA به دست آمده اند. بر اساس مشاهده های انجام شده روی ظاهر رشد یافته میکروارگانیسم ها، تمامی میکروارگانیسم های خالص سازی شده باکتری

ازیابی باکتری های تمیزی گندله نفت و توانایی آن ها در رفع آلودگی های...-علی (ضا) پیشگاهی فراسانی و همگاران

در طول ۸ روز افزایش یافته و پس از آن با کاهش روبه رو شده و در نهایت به $OD600 = 0.071$ رسیده است. بیشترین توده سلولی در روز هشتم وجود دارد در حالی که میزان تجزیه مازوت در تمام ۱۰ روز تقریباً یکسان بوده است.

با توجه به شکل شماره ۴ مخلوط باکتریایی شامل $NO4$, $NO3$, $NO2$, $PG1$ و $NG2$ که توانایی تجزیه مازوت را از خود نشان داده اند، در بستر ثابت توانستند غلظت مازوت شناور را از 2000 ppm به 1420 ppm کاهش داده و طی ۴ روز اول رشدی معادل $OD600 = 0.09$ داشته باشند. پس از آن با کاهش زیست توده مواجه شده ولی دوباره افزایش یافته است و در نهایت در روز دهم به میزان $OD600 = 0.08$ رسیده است. با وجود تغییرات زیاد در رشد مخلوط میکروبی، سرعت تجزیه مازوت یکسان بوده است تنها 29 درصد از مازوت طی ۱۰ روز تجزیه شده است.

باکتری $NO4$ به عنوان مستعدترین سویه به دست آمده در این مطالعه، در محیط معدنی رشد کرده و باعث تجزیه مازوت شناور شده است. شکل شماره ۲ تغییرات غلظت مازوت و رشد سلول های باکتری را بر حسب گذر زمان نشان می دهد. باکتری $NO4$ طی ۱۰ روز به تدریج غلظت مازوت را از 2000 ppm به 1232 ppm کاهش داده است. رشد باکتری در این مدت از میزان تلقیح اولیه به اندازه $OD600 = 0.04$ به بیشترین مقدار خود در روز هشتم رسیده است که معادل $OD600 = 0.14$ بوده و سپس با رفتن در فاز سکون و مرگ طی ۲ روز به میزان $OD600 = 0.12$ رسیده است.

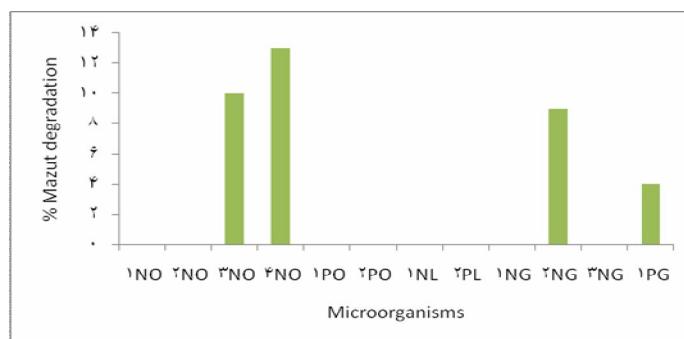
تجزیه مازوت تثبیت شده توسط باکتری $NO4$ انجام گرفت. شکل شماره ۳ بیان می کند که غلظت مازوت تثبیت شده پس از گذشت ۱۰ روز از 2000 ppm به 1360 ppm رسیده است. باکتری $NO4$ طی ۱۱ روز به $OD600 = 0.04$ رسیده است.

جدول شماره ۱. اجزا به کار رفته در ترکیب آماده شده برای PCR

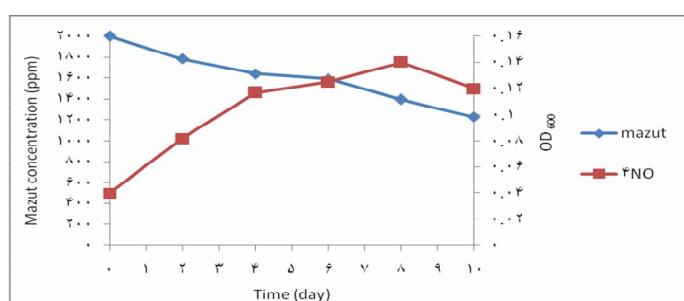
DNA الگو	آنژیم Taq DNA Polymerase	R پرایمر (20pmole/μl)	F پرایمر (20pmole/μl)	dNTP (10 mM)	منیزیم کلرید (25 mM)	بافر (10X)PCR	آب مقطر استریل	مواد
10 μl	1/5 μl	2/5 μl	2/5 μl	5 μl	7/5 μl	12/5 μl	83/5 μl	حجم

جدول شماره ۲. مشخصات و ویژگی های باکتری های جداشده

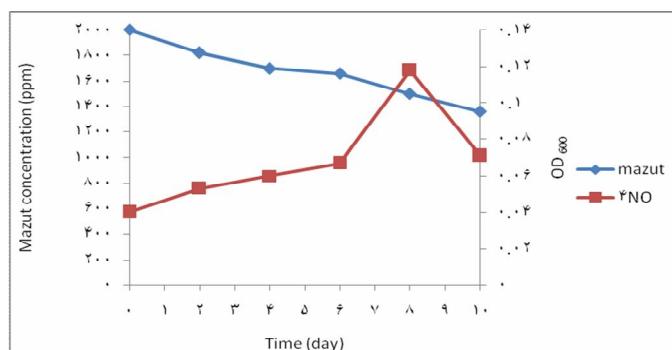
مکان نمونه برداری	محیط کشت	میکروگالانیسم	شكل کلی	رنگ کلوفنی	شكل باکتری سلولی	نوع دیواره
خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی در شهر مشهد	NA	NO1	دایره ای، بسیار ریز	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی در شهر مشهد	NA	NO2	دایره ای، متوسط	سفید	کروی (کوکسی)	گرم منفی
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NO3	دایره ای، متوسط	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NO4	دایره ای، متوسط	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	PDA	PO1	دایره ای، بسیار ریز، به هم چسبیده	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	PDA	PO2	دایره ای، متوسط	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NG1	دایره ای، ریز	سفید	میله ای (باسیل)	گرم مثبت
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NG2	دایره ای، ریز، به هم چسبیده	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
خاک نزدیک مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NG3	دایره ای، بسیار ریز	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
لجن و گازوئیل مخلوط به آب در مخزن گازوئیل در شهر مشهد	PDA	PG1	بی شکل و سیال	زرد	میله ای (باسیل)	گرم منفی
لجن و گازوئیل مخلوط به آب در مخزن گازوئیل در شهر مشهد	NA	NL1	دایره ای، بسیار ریز	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی
لجن و گازوئیل مخلوط به آب در مخزن گازوئیل در شهر مشهد	PDA	PL2	دایره ای، بسیار ریز	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی



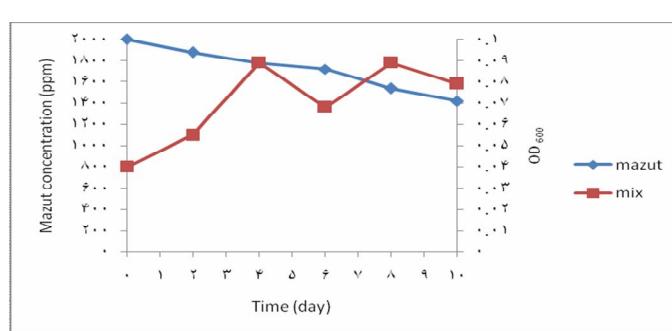
شکل شماره ۱. میزان تجزیه زیستی مازوت توسط ۱۲ باکتری جدا شده از محیط



شکل شماره ۲. تغییرات غلظت مازوت و رشد باکتری NO4 بر حسب زمان طی تجزیه زیستی مازوت شناور



شکل شماره ۳. تغییرات غلظت مازوت و رشد باکتری NO4 بر حسب زمان طی تجزیه زیستی مازوت ثبیت شده



شکل شماره ۴. تغییرات غلظت مازوت و رشد مخلوط میکروبی بر حسب زمان طی تجزیه زیستی مازوت شناور

بحث و نتیجه گیری

Enterobacter به عنوان تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنی،(۲۰)، و با تولید آنزیم آلکان هیدروکسیلаз تجزیه کننده توانمند آلکان شناخته شده است،(۲۱). از *E.cloacae* از خاک های آلوده به نفت سنگین حوزه سروش جداسازی شده و توانایی زیادی در تجزیه نفت سنگین داشته است،(۱۶). *E.cloacae* جاذشده از خاک های آلوده نفتی چین،(۲۲)، توانایی تجزیه نفت خام را داشته است،(۳). بنا بر این *E.cloacae* گونه هایی هستند که سابقه تجزیه نفتی را در نقاط مختلف جهان از خود نشان داده اند و سویه BBRC10061 به دست آمده از شهر مشهد نیز در جهت تجزیه هیدروکربن های پیچیده موجود در مازوت توانمند بوده است. با توجه به مطالعات بسیار اندک در زمینه تجزیه زیستی مازوت و مطالعات گسترده بر روی هیدروکربن های مختلف تا حدودی می توان میزان موفقیت مطالعه حاضر را در مقایسه با مطالعات انجام شده مورد بررسی قرار داد. زیست درمانی خاک آلوده به مازوت توسط گونه های قارچی توانسته میزان ۳۰۰ mg از غلظت اولیه ۵۰۰۰ mg مازوت بر کیلوگرم خاک را طی ۱۰ روز کاهش دهد و پس از ۱۴۰ روز به غلظت ۱۵۰۰ mg بر کیلوگرم خاک *Trichoderma harzianum* توانایی بیشتری برای تجزیه مازوت نشان داده است،(۲۵). نتایج حاصل از تجزیه زیستی مازوت موجود در خاک به روش برون جا نشان داده است که طی ۵۰ روز ۳ گرم از ۵ گرم مازوت موجود در ۱ کیلوگرم خاک تجزیه شده است و نهایتاً پس از ۱۵۰ روز به غلظت ۵/۰ گرم بر کیلوگرم خاک رسیده است،(۲۶). در حضور BTEX به عنوان تنها منبع کربن

و انرژی پس از ۴ روز *Ralstonia picketti* و *Alcaligenes piechaudii* خود به ترتیب OD600/۰/۵ و OD600/۰/۸ رسیده و طی ۱۰ روز تنها حدود ۱۰۰ ppm از BTEX را تجزیه کرده اند،(۲۷). مخلوطی از باکتری ها شامل *Bacillus* و *Enterobacter* توانستند در مدت ۱۰ روز نفت خام را از ۱ گرم به ۰/۲ گرم کاهش دهند،(۲۸). میکرووارگانیسم های بومی و سازگار با محیط نفتی بسیار توانمندتر عمل کرده و سرعت بیشتری در تجزیه زیستی هیدروکربن ها دارند،(۲۹-۳۱). در کل می توان اذعان کرد مطالعه حاضر توانمندتر از سایر تحقیقات بوده و توانسته با بررسی شرایط عملیاتی بهینه و مناسب هیدروکربن های مازوت را با درصد بالاتری تجزیه نماید.

با توجه به تحقیقات بسیار کم درباره تجزیه زیستی مازوت با استفاده از میکرووارگانیسم های شناسایی شده، این مطالعه توانسته با جداسازی سویه (BBRC10061) *E.cloacae* بومی شهر مشهد تجزیه مازوت را بررسی نماید. با توجه به گزارش های ارائه شده در زمینه تجزیه مازوت می توان گفت سویه(BBRC10061) از توانایی تجزیه کننگی بالایی برخوردار است. جلوگیری از چسبیدن مازوت به دیواره های زیست واکنشگاه می تواند بازده تجزیه را بیشتر کند ولی استفاده از مخلوط میکروبی به جای سویه(BBRC10061) تاثیری بر افزایش بازده تجزیه نداشته است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد برای حمایت مالی از این پژوهه قدردانی می گردد

References

- 1-Asghari H. [Isolation and identification of hydrocarbons of mazut via extraction methods of column chromatography and high-performance liquid chromatography]. *J Uni Isfahan* 1991;45:42-9.(Persian)
- 2-Vieira PA. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J Hazard Mater* 2007;140:52-9.
- 3-Marry PA, Coin D, Sidorf H. Biodegradation of oil polluted soils. *J Hazard Mater* 2008;110:32-8.
- 4-Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 1990;54:305-15.
- 5-Vieira PA, Colwell RR. Biodegradation of effluent contaminated with oil. *J Hazard Mater* 2009;148:73-9.
- 6-Ewies JB, Leahy JG, Colwell RR. Bioremediation principles. Mc Grow-Hill; 1998.
- 7-Juhasz AL, Nadiu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeter Biodegrad* 2000;45:57-88.
- 8-Pala D, Freier D. Bioremediation of clay soil impacted by petroleum. *Engenharia Técnica* 2002;10:29-32.
- 9-Xu R, Obbard JP. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments. *J Environ Qual* 2003;32:1234-43.
- 10-Sharma SL, Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* sp. *Biodegrad* 2001; 11:289-94.
- 11-Niehaus F, Ewies JB, Leahy JG, Colwell RR. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:71-29.
- 12-Talaie AR, Jafaarzahe N, Talaie M, Beheshti M. [Biodegradation of aromatic compounds in crude oil by isolated microorganisms from environment]. *Zah-edan Uni Med Sci J* 2010;70:68-80.(Persian)
- 13-Mashayekhi M, Kahsari S, Farajpour A. [Isolation of porphyrin compounds reducing bacteria in crude oil]. *Iran J Chem Eng* 2008;4:51-7.(Persian)
- 14-Rashid AF, Rezaei KR, Farzadkia M, JoneidyJafari A, NabizadehR. Survey of phenanthrene biodegradation's model in contaminated soils by *Acinetobacter* sp. *Iran J Health Environ* 2009;2:196-202.(Persian)
- 15-Yousefi KD, Heidari-Keshel S. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. *Int J Environ SciTech* 2009;6:435-9.
- 16-Darvishi P, Heidari-Keshel S. Biodegradation of heavy crude oil in wastewater by an efficient strain, ERCPPI-1. *Desalin Water Treat* 2011;28:46-54.
- 17-Arbabi M, Heidari-Keshel S. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in petroleum contaminated soils. *Iran J Chem Chem Eng* 2009;28:53-9.
- 18-Arash M, Miri M, Malosak S, Heidari-Keshel S. Biodegradation of heavy hydrocarbons in soils. *Iran J Chem Chem Eng* 2010;38:63-9.
- 19-Fardin KD, Heidari-Keshel S. Extraction of oil compound. *Int J Environ Sci Tech* 2011;12:535-9.
- 20-Kafilzadeh F, Miri M, Ghaderi I, Hamideh K. Isolation and identification of hydrocarbons degrading bacteria in soil around Shiraz Refinery. *Africa J Microbiol Res* 2011;4:3084-9.
- 21-Chikere CB, Shidner P, Sindhof W. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech J* 2011;79:431-8.
- 22-Hua X. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere* 2010;80:951-6.
- 23-Saadoun I, Hua X, Sinor T, Liebert G, Hiemen S. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert(The Badia Region). *Brazil J Microbiol* 2008;39:453-6.
- 24-Kalnina D. Problems in cleanup procedures contaminated by mazut. *Materialzinate* 2009;20:74-83.
- 25-Beskoski VP, Kafilzadeh F, Miri M, Ghaderi I, Hamideh K, Timoty Y, et al. Change of isoprenoids, steranes and trepanes during ex situ bioremediation of mazut on the industrial scale. *J Serb Chem Soc* 2010;75:1605-16.
- 26-Yaghmaei S. Bioremediation of PAH contaminated soil[Dissertation]. Sharif Uni Technol J 1997;16:62-8.(Persian)

- 27-Płaza GA, Beškoski VP, Kafilzadeh F, Miri M, Ghaderi I, Hamideh K. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23:533-42.
- 28-Zhang Z, Kafilzadeh F, Miri M, Ghaderi I, et al. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technol* 2010;101:8452-6.
- 29-Marchal R. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil Gas Sci Technol* 2003; 58:441-8.
- 30-Gertler C, Beškoski VP, Kafilzadeh F, Miri NB, Ghaderi D, Hamideh H. Populations of heavy fuel oil-degrading marine microbial community in presence of oil sorbent materials. *J Appl Microbiol* 2009; 107:590-605.
- 31-Lodha B, Hertler C, Gieškoski NP, Mafilzadeh F. Biodegradation of pyridine by an isolated bacterial consortium/strain and bio-augmentation of strain into activated sludge to enhance pyridine biodegradation. *Biodegrad* 2008;19:717-23.



Evaluation of Petroleum-Degrading Bacteria and Their Ability in Eliminating Bioenvironmental Pollutants

Heidari keshel S¹, Rahnama Falavarjani I², Chackoshian khorasani A^{2}, Mashreghi M³, Ebrahimi M¹, Yaghmaei S², Etedali A⁴, Normoradi H⁵, Solimani S⁶,*

(Received: 1 May. 2013)

Accepted: 12 Aug. 2013)

Abstract

Introduction: Biodegradation of heavy fuel oil(Mazut) by indigenous competent microorganisms is one of the new fields of biotechnology in petroleum industries. Biocompatibility and inexpensiveness characteristics of the method have developed its application day to day. Isolation and identification of oil bacteria can be an effective approach for degrading heavy fuel oil.

Materials & Methods: Sampling of the soil and water sources contaminated with oil components was carried out. The samples were incubated on special culture conditions to screen potential microorganisms. Then, their degrading ability was investigated on mazut. Best microorganisms were selected and identified. Then, the degradation capability for mazut was investigated in matrices containing fixed and floating mazut by the strain bacteria.

Findings: The new strain Enterobacter cloacae (BBRC10061) was isolated and identified from oil contaminated soil in Mashhad to biodegrade mazut. In aerobic

condition, 13% of mazut (1%v/v) containing in mineral environment was degraded by BBRC10061 during a 10-day period. Evaluating the fixation and floatation of mazut and also implicating the microbial mixture, demonstrated that the floating the mazut and preventing its adhesion into the bioreactor wall increased the efficiency process. However, the mixture was not able to considerably increase the mazut degradation.

Discussion & Conclusion: The results of this study represented the strain BBRC1-0061 could be used as a proper degrader for biodegradation of the heavy hydrocarbons and oil compounds.

Keywords: isolation, mazut, biodegradation, oil hydrocarbons, enterobacter cloacae

1. Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. School of Chemical & Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

3. Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4. Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

5. Dept of Environmental Health, Faculty of Health, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

6. Dept of Microbiology, Faculty of Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran

* (corresponding author)