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

سعید حیدری کشل[۱]، ایمان رهنما فلاورجانی [۲]، علی رضا چکشیان خراسانی[۲*]، منصور مشرقی[۳]، مریم ابراهیمی[۱]، سهیلا یغمایی[۲]، احمد اعتدالی[٤]، ،حشمت الله نور مرادی [٥]، سمیه سلیمانی[٦]

۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، 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 دریافت:۹۲/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

چکیده

مقدمه: تجزیه زیستی نفت کوره سنگین(مازوت) به وسیله میکروارگانیسم 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 به 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 میکروارگانیسم های مستعد جداسازی شوند. پس از جداسازی، توانایی تجزیه کنندگی آن ها برروی مازوت بررسی شد. بهترین میکروارگانیسم 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 هوازی 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 می‌تواند 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

مقدمه

مازوت دارای هیدروکربن های سنگین مانند آسفالتن، رزین ها، آلکان های بلند زنجیر، سیکلوآلکان 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 شیمیایی، سادگی فرایند و هزینه کمتر آن است،(۷-۴). استفاده از میکروارگانیسم 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 میکروارگانیسم خاصی را از محیطی جدا کرد،(۱۱). در ایران میکروارگانیسم های بومی توانمند مانند Pseudomonas aeruginosa، Pseudomonas stutzeri، Provedenica stuartii، Acinetobacter sp، Bacillus Cereus، Micrococcus sp، Enterobacter cloacae، Serratia sp از نقاط 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.(۱۷-۱۲)

هدف از این پژوهش، تجزیه ترکیبات نفتی مازوت از طریق شناسایی و به کارگیری میکروارگانیسم های بومی توانمند موجود در طبیعت و بررسی تاثیر شرایط فرایندی مختلف بر آن بوده است. برای تحقق 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 میکروارگانیسم های توانمند بومی جداسازی و از طریق شناسایی اولیه و سپس با کمک روش 16S rDNA بررسی شدند. در ادامه تاثیر تجزیه کنندگی آن ها بر روی مازوت در شرایط مختلف بررسی گردید.

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 تهیه شده است. کلروفرم با خلوص ۹۹/۶ درصد برای استخراج و رقیق سازی مازوت از شرکت شیمی پژوهش آسیا تهیه 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 تهیه محیط معدنی از شرکت مرک آلمان خریداری شده است. دو محیط کشت NB و PDB و نیز ماده آگارآگار از شرکت Scharlau خریداری شده اند. کیت استخراج DNA از شرکت Bioneer و کیت PCR از شرکت Genet Bio تهیه شده است. پرایمرهای 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') و 1492R(5'-GGT 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 ۰/۱ گرم MgSO4.7H2O، ۰/۰۱ گرم CaCl2، ۰/۰۱ گرم FeSO4.7H2O، ۱ گرم (NH4)2SO4، ۰/۵ گرم KH2PO4 و ۰/۵ گرم K2HPO4 در یک لیتر آب مقطر ساخته شده است. میزان pH محیط روی ۶/۸ تنظیم شد. از این محیط در ۳ ارلن ml۲۵۰ و در هر کدام حجم ml۱۰۰ ریخته، سر هر ارلن با پنبه و فویل بسته شده و سپس اتوکلاو گردیده اند. از هر نمونه خاک ابتدا ۵ گرم خاک در یک بشر ریخته و پس از اضافه شدن ml۱۰۰ آب مقطر عاری از آلودگی به هر نمونه، این سوسپانسیون ها توسط شیکر در دمای آزمایشگاه و در rpm۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه به طور کامل مخلوط شده اند. ml۵ از نمونه آبی نیز با ml۱۰۰ 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 ml۱ برداشته و در شرایط کاملاً استریل به محیط های معدنی اضافه می شود. هر ارلن برای یک نمونه آماده 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 rpm۱۶۰ قرار می گیرند. پس از ۵ روز، از هر ارلن ml ۱ 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 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 گرماگذاری 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 16S rDNA: این مرحله پنج بخش استخراج DNA، تکثیر قطعه 16S rDNA توسط PCR، الکتروفورز محصول 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 16S rDNA توسط PCR از پرایمرهای عمومی 27F (-5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT) 1492R T-3') استفاده شد. طول قطعه قابل تکثیر در حدود ۱۵۰۰bp تخمین زده شد. محیط آماده شده برای PCR به حجم ۱۲۵µl 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 16S rDNA توسط PCR با برنامه زیر انجام گرفت:

-واکنش واسرشت اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه طی یک چرخه.

-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 TAE 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(Blast Local Alignment Search Tool)،(۱۸)، و با توجه به شناسایی مقدماتی میکروارگانیسم، نوع و سویه باکتری شناسایی شد.

آماده سازی زیست واکنشگاه: محیط رشد میکروارگانیسم ها برای تجزیه مازوت شناور و تثبیت شده، تشکیل شده از ترکیب ۰/۱ گرم MgSO4.7H2O، ۰/۰۱ گرم CaCl2، ۰/۰۱ گرم FeSO4.7H2O، ۱ گرم (NH4)2SO4، ۰/۵ گرم KH2PO4 و ۰/۵ گرم K2HPO4 در یک لیتر آب مقطر که در زیست واکنشگاه های لوله ای(لوله های پایه دار سانتریفیوژ) با حجم ۵۰ml توزیع شده اند. pH محیط معدنی روی ۶/۸ تنظیم شده و با افزودن ۲۰۰۰ppm(۰/۱گرم در ۵۰ ml) مازوت به زیست واکنشگاه، محیط فرایند توسط اتوکلاو استریل شد. سامانه بستر ثابت به دو شکل مازوت شناور و مازوت تثبیت شده تهیه گردید. برای تهیه سامانه مازوت تثبیت 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 میکروارگانیسم مورد نظر تلقیح شد به طوری که OD600 محیط معدنی به میزان ۰/۰۴ 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 اندازه‌گیری توانمندی میکروارگانیسم های جدا شده در تجزیه مازوت از شیکر انکوباتور در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد و دور ۱۶۰rpm استفاده شده است. محیط معدنی زیست واکنشگاه ها نیز مانند آن چه در زیست واکنشگاه های بستر ثابت بوده، آماده گردید و با افزودن ۱۰۰۰۰ppm(۰/۵ گرم در ۵۰ ml) مازوت به محیط معدنی و هم چنین با تلقیح هر یک از میکروارگانیسم 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.

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

زیست واکنشگاه ml ۳ 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 محیط معدنی 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 λ=450nm 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 λ=600nm 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 رشد کرده بر روی محیط کشت NA و ۲ میکروارگانیسم PO1 و PO2 رشد کرده بر روی PDA از خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی واقع در شهر مشهد به دست آمده اند. ۳ میکروارگانیسمNG1، 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 بوده اند. نوع دیواره سلولی باکتری های خالص شده توسط رنگ آمیزی گرم و سپس مشاهده با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. شکل ظاهری کلنی 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 سویه‌ای جدید از این باکتری محسوب می شود. این باکتری در گروه Gamma Proteobacteria، متعلق به خانواده Enteroba-cteriaceae و از جنس Enterobacter است.(۱۸،۱۹)

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 جداشده قابلیت بیشتری از خود نشان داده و با تجزیه ۱۳ درصدی مازوت(۱۳۰۰ppm از ۱۰۰۰۰ppm) 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 تامین منبع کربن بوده اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 ۲۰۰۰ppm به ۱۲۳۲ppm کاهش داده است. رشد باکتری در این مدت از میزان تلقیح اولیه به اندازه ۰/۰۴ OD600 به بیشترین مقدار خود در روز هشتم رسیده است که معادل ۰/۱۴ OD600 بوده و سپس با رفتن در فاز سکون و مرگ طی ۲ روز به میزان ۰/۱۲ OD600 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 ۲۰۰۰ppm به ۱۳۶۰ppm کاهش یافته و دانسیته نوری باکتری از ۰/۰۴ OD600 به ۰/۱۱۸OD600 در طول ۸ روز افزایش یافته و پس از آن با کاهش روبه رو شده و در نهایت به ۰/۰۷۱ OD600 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، NG2 و PG1 که توانایی تجزیه مازوت را از خود نشان داده اند، در بستر ثابت توانستند غلظت مازوت شناور را از ۲۰۰۰ppm به ۱۴۲۰ppm کاهش داده و طی ۴ روز اول رشدی معادل ۰/۰۹ OD600 داشته باشند. پس از آن با کاهش زیست توده مواجه شده ولی دوباره افزایش یافته است و در نهایت در روز دهم به میزان ۰/۰۸ OD600 رسیده است. با وجود تغییرات زیاد در رشد مخلوط میکروبی، سرعت تجزیه مازوت یکسان بوده است تنها ۲۹ درصد از مازوت طی ۱۰ روز تجزیه شده است.

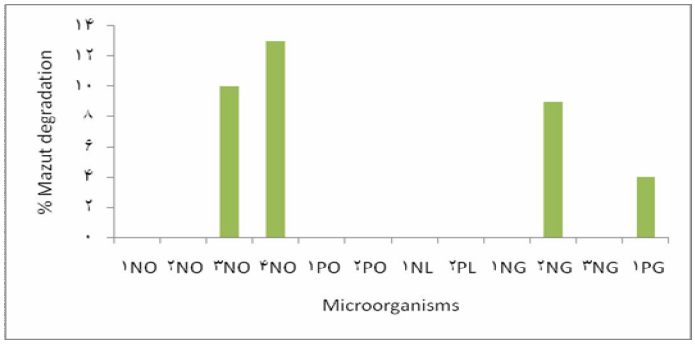
جدول شماره ۱. اجزا به کار رفته در ترکیب آماده شده برای PCR

مواد	آب مقطر استریل	بافر (10X)PCR	منیزیم کلرید (25 mM)	dNTP (10 mM)	پرایمر F (20pmole/µl)	پرایمر R (20pmole/µl)	آنزیم Taq DNA Polymerase	DNA الگو
حجم	**83/5 µl**	**12/5 µl**	**7/5 µl**	۵ **µl**	**2/5 µl**	**2/5 µl**	**1/5 µl**	**10 µl**

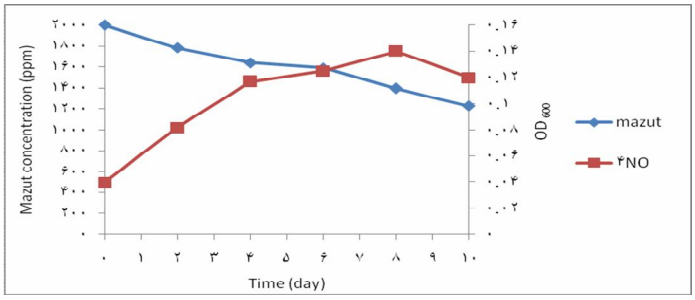
جدول شماره ۲. مشخصات و ویژگی های باکتری های جداشده

مکان نمونه برداری	محیط کشت	میکروارگانیسم	شکل کلنی	رنگ کلونی	شکل باکتری	نوع دیواره سلولی
خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی در شهر مشهد	**NA**	**NO1**	دایره ای، بسیار ریز	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
		NO2	دایره ای، متوسط	سفید	کروی (کوکسی)	گرم منفی
		NO3	دایره ای، متوسط	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی
		NO4	دایره ای، متوسط	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی
خاک آلوده به فاضلاب های نفتی و گازوئیل شرکت اتوبوسرانی در شهر مشهد	**PDA**	**PO1**	دایره ای، بسیار ریز، به هم چسبیده	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
		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
		NG2	دایره ای، ریز، به هم چسبیده	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
		NG3	دایره ای، بسیار ریز	سفید	کروی (کوکسی)	گرم مثبت
خاک نزدیک 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
	PDA	**PL2**	دایره ای، بسیار ریز	سفید	میله ای (باسیل)	گرم منفی

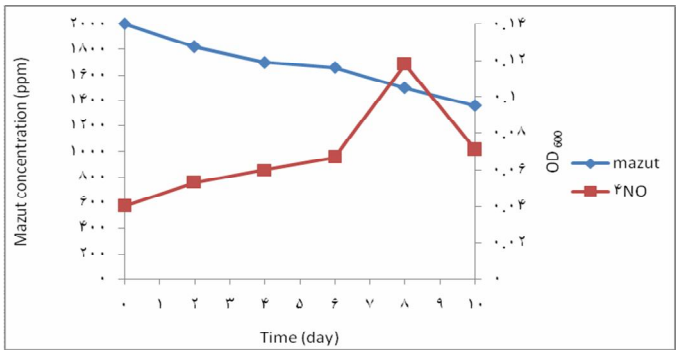
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]



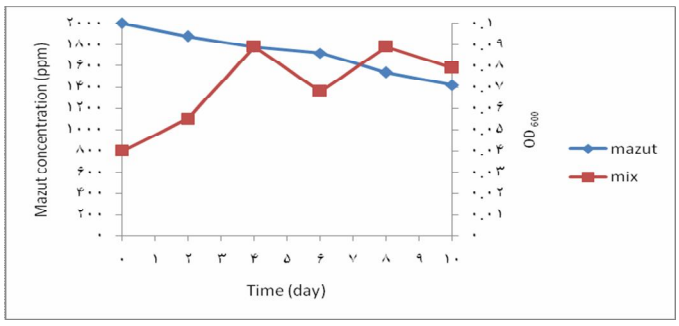
شکل شماره ۱. میزان تجزیه زیستی مازوت توسط ۱۲ باکتری جدا شده از محیط



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 تثبیت شده



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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

بحث و نتیجه گیری

Enterobacter به عنوان تجزیه کننده ترکیبات هیدروکربنی،(۲۰)، و با تولید آنزیم آلکان هیدروکسیلاز تجزیه کننده توانمند آلکان شناخته شده است،(۲۱). 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 جداشده از خاک های آلوده نفتی چین،(۲۲)، توانایی تجزیه نفت خام را داشته است،(۲۳). بنا بر این Enterobacter ها گونه هایی هستند که سابقه تجزیه نفتی را در نقاط مختلف جهان از خود نشان داده اند و سویهBBRC10061 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 ۳۰۰mg از غلظت اولیه ۵۰۰۰mg مازوت بر کیلوگرم خاک را طی ۱۰ روز کاهش دهد و پس از ۱۴۰ روز به غلظت ۱۵۰۰mg بر کیلوگرم خاک برساند،(۲۴). در بین قارچ ها 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 ۰/۵ 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 به بیشترین مقدار رشد خود به ترتیب OD600 ۰/۵ و OD600 ۰/۸ رسیده و طی ۱۰ روز تنها حدود ۱۰۰ppm 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). میکروارگانیسم های بومی و سازگار با محیط نفتی بسیار توانمندتر عمل کرده و سرعت بیشتری در تجزیه زیستی هیدروکربن ها دارند،(۲۷-۳۱،۳۰،۲۹). 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 میکروارگانیسم های شناسایی شده، این مطالعه توانسته با جداسازی سویه E.cloacae(BBRC10061) 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 کنندگی 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 پروژه قدردانی می گردد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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 Temica 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;51:711-29.

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.(Per-sian)

13-Mashayekhi M, Kahsari S, Farajpour A. [Isolation of porphyrin compounds reducing bacteria in crude oil]. Iran J Chem Chem Eng 2008;4:51-7.(Persian)

14-Rashid AF, Rezaei KR, Farzadkia M, JoneidyJafari A, NabizadehR. Survey of phenantherene 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-Beškoski 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)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

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

Heidari keshel S[1], Rahnama Falavarjani I[2], Chackoshian khorasani A[2], Mashreghi M[3], Ebrahimi M[1], Yaghmaei S[2], Etedali A[4],Normoradi H[5],Solimani S[6],*

(Received: 1 May. 2013 Accepted: 12 Aug. 2013)

Abstract

Introduction: Biodegradation of hea-vy fuel oil(Mazut) by indigenous competent micro-organisms is one of the new fields of biote-chnology in petroleum industries. Biocom-patibi-lity and inexpensiveness characterist-ics of the method have developed its appl-ication day to day. Isolation and identify-cation of oil bacteria can be an effective approach for degrading heavy fuel oil.

Materials & Methods: Sampling of the soil and water sources contamin-ated 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 se-lected and identified. Then, the degr-adation capa-bility for mazut was in-vestigated in ma-trices containing fix-ed and floating mazut by the strain bacteria.

Findings: The new strain Entero-bacter cloacae (BBRC10061) was isolated and identified from oil conta-minated soil in Mashhad to biod-egrade mazut. In aerobic condition, 13% of mazut (1%v/v) containing in mineral environment was degraded by BBRC10061 during a 10-day period. Eval-uating the fixation and floatation of mazut and also impli-cating the microbial mixture, demon-strated that the floating the mazut and preventing its adoration into the biore-actor wall increased the effici-ency process. However, the mixture was not able to considerably increase the mazut degr-adation.

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, biodegradat-io-n, 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 Enuironmental Health,Faculty of Health, Ilam Uniuersity of Medical Sciences, Ilam, Iran
6. Dept of Microbiology, Faculty of Scinces, Hamadan Branch, Islamic Azad Uniuersity, Hamadan, Iran
** (corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]